



**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**Sistemas mucoadesivos de gelatina/amido retrogradado
destinados à liberação colônica do bevacizumabe para o
tratamento do câncer colorretal**

Valéria Maria de Oliveira Cardoso

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

Araraquara/SP

2019



**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Sistemas mucoadesivos de gelatina/amido retrogradado
destinados à liberação colônica do bevacizumabe para o
tratamento do câncer colorretal**

Valéria Maria de Oliveira Cardoso

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

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

**Araraquara/SP
2019**

Ficha Catalográfica

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

C268s Cardoso, Valéria Maria de Oliveira.
Sistemas mucoadesivos de gelana/amido retrogradado destinados à liberação colônica do bevacizumabe para o tratamento do câncer colorretal / Valéria Maria de Oliveira Cardoso. – Araraquara, 2019.
229 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: Maria Palmira Daflon Gremião.
Coorientadora: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury.

1. Sistemas nanoestruturados. 2. Liberação cólon específica. 3. Polissacarídeos naturais. 4. Goma gelana. 5. Amido retrogradado. 6. Sistemas mucoadesivos. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Cury, Beatriz Stringhetti Ferreira, coorient. III. Título.

CAPES: 33004030078P6

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Sistemas mucoadesivos de gelatina/amido retrogradado destinados à liberação colônica do bevacizumabe para o tratamento do câncer colorretal


AUTORA: VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA CARDOSO

ORIENTADORA: MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO


COORIENTADORA: BEATRIZ STRINGHETTI FERREIRA CURY

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. JULIO CESAR BORGES
Instituto de Química / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Profa. Dra. PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP


Prof. Dr. MARCO VINICIUS CHAUD
Departamento de Farmácia / Universidade de Sorocaba

Araraquara, 22 de fevereiro de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente à **minha filha**, pela motivação e felicidade que me proporcionou com a sua chegada, e dedico também, com todo meu amor e gratidão, **aos meus pais, marido e irmãos** que não mediram esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida, e por não me deixarem desistir. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o maior responsável por essa conquista, que nunca me abandonou e me deu força, determinação e perseverança necessárias para prosseguir.

Aos meus pais, **Maria Aparecida e José**, exemplos de vida, força e humildade, pelos valores transmitidos e por tudo que fazem por mim e pela minha filha.

Ao meu marido, **Wagner**, pelo seu companheirismo, suporte emocional e pela paciência durante todos esses anos.

Aos meus irmãos **Isabel Cristina e José Augusto** pelo apoio e por serem meus verdadeiros amigos, permanecendo ao meu lado nos momentos que mais precisei.

Ao querido **Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista** que eternizo em meu coração e gostaria de prestar sentida homenagem, agradecendo pela oportunidade concedida.

A minha orientadora **Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**, pelo incentivo e todas as oportunidades proporcionadas, indispensáveis para ampliar meus conhecimentos. Muito obrigada!

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury** por todos os conhecimentos transmitidos, sempre de maneira muito paciente. Obrigada por sua incontestável dedicação para conclusão deste e de todos os trabalhos do grupo.

Ao **Prof. Marlus Chorilli** por toda contribuição dada no exame geral de qualificação e na banca de defesa, com importantes colaborações para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À **Dra. Andréia Bagliotti Meneguim** pelas importantes e valiosas contribuições dadas no exame geral de qualificação e por toda ajuda prestada todas as vezes que precisei.

À **Profa Fabíola Manhas Verbi Pereira** do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Unesp Araraquara, pelos ensinamentos e enorme contribuição com o planejamento fatorial, pela dedicação e empenho em me ajudar todas as vezes que precisei.

Aos **Membros da Banca Examinadora** de defesa desta tese, por sua disposição, dedicação e paciência em analisar este trabalho e trazer contribuições preciosas para sua finalização. Muito obrigada!

À todos os **colegas do laboratório**, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, e pelos incentivos e compartilhamento de conhecimentos e experiências. Agradeço a **Natalia Noronha** pela enorme contribuição com o desenvolvimento do método de validação do fármaco e **Fernanda Isadora Boni** por toda ajuda prestada.

Ao **Instituto de Química da UNESP/Araraquara**, pela realização das análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho. E ao **LMA-IQ** pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao **Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos (USP)**, em especial ao **Prof. Dr. Júlio César Borges**, pela contribuição e ajuda com as análises de Dicroísmo Circular e Fluorescência, e a doutoranda **Vanessa Kirally** por todo auxílio prestado durante a realização das análises e tratamento dos dados.

Ao **Centro de Pesquisa em Ótica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (USP)**, coordenado pelo **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**, e em especial a pós doc **Hilde Buzzá** pela imensurável ajuda e boa vontade durante todo ensaio na CAM, e por tamanha dedicação a pesquisa.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), coordenado pelo **Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan**, em especial ao doutorando **Rone Aparecido De Grandis** pela colaboração e dedicação nos ensaios celulares, pelo auxílio e conhecimento transmitidos para a interpretação dos resultados.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, especialmente à técnica do Laboratório **Natália**, pela ajuda dada na realização de meus experimentos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado no País (Processo 2015/21412-0).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** (Código 001) pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros anos do curso de doutorado.

À equipe da **Seção de Pós-graduação** pela atenção e os serviços prestados.

EPIGRAFE

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir.”

[Dalai Lama]

“A dignidade não consiste em possuir honrarias, mas em merecê-las”

[Aristóteles]

Sistemas mucoadesivos de gelana/amido retrogradado destinados à liberação colônica do bevacizumabe para o tratamento do câncer colorretal.**RESUMO**

A administração oral de fármacos de origem proteica, como o bevacizumabe (BVZ) impõe grandes desafios, considerando sua instabilidade físico-química frente às condições variáveis de pH e conteúdo enzimático nos segmentos superiores do trato gastrointestinal (TGI). No presente trabalho, nanocarreadores orais baseados em goma gelana (GG) e amido retrogradado (AR) foram delineados como potencial estratégia tecnológica para a efetiva proteção do BVZ, bem como para a modulação de suas propriedades físico-químicas, de liberação e dos padrões de interação com a interface biológica, a fim de se alcançar a liberação cólon-específica fármaco de origem proteica. A retrogradação do amido foi explorada a fim de adequar suas propriedades, como solubilidade, intumescimento, propriedades reológicas, mucoadesividade, resistência enzimática, de acordo com o objetivo pretendido. Os sistemas nanoestruturados foram obtidos pela complexação polieletrólítica dos polímeros com o BVZ, e o efeito da reticulação iônica foi também avaliado. Os efeitos das concentrações da mistura polimérica (GG/AR), de BVZ e de cloreto de alumínio (AlCl_3) no diâmetro médio, no índice de polidispersidade (PdI) e no potencial zeta (PZ) das nanopartículas foram avaliados empregando um planejamento fatorial (PF) completo 3^3 . Nanopartículas com diâmetro médio entre 191,7 e 629,87 nm, reduzido PdI (inferior 0,51) e PZ superior à -20 mV foram obtidas. O processo de reticulação levou ao aumento do diâmetro das partículas, as quais apresentaram forma esférica. A eficiência de incorporação do BVZ foi elevada (56,16 % e 100 %) e os espectros de absorção na região do IV evidenciaram que as interações entre os polímeros e o BVZ devem ser predominantemente supramoleculares. A manutenção das estruturas secundária e terciária da proteína após a incorporação nos nanocarreadores foi evidenciada pelas análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e pela espectroscopia de fluorescência intrínseca. A estabilidade térmica do BVZ incorporado nas nanopartículas reticuladas ou não foi demonstrada pela microcalorimetria exploratória diferencial. A expressiva modificação do comportamento reológico da mucina na presença das nanopartículas reticuladas ou não reticuladas, evidenciou as propriedades mucoadesivas dos sistemas, sendo que a reticulação iônica desfavoreceu a mucoadesão em meio ácido. A capacidade mucoadesiva associada às reduzidas taxas de liberação do BVZ (< 38 % em pH 1,2 e < 31 % em pH 6,8) devem favorecer o acúmulo do fármaco no sítio de ação. A integridade estrutural do BVZ após incubação das nanopartículas nos meios de dissolução (HCl 0,1 N pH 1,2 e tampão fosfato 0,1 M pH 6,8) foi evidenciada pela análise de dicroísmo circular. A baixa permeabilidade (P_{app} $0,5 \times 10^{-6}$ cm.s⁻¹) e a redução da citotoxicidade do BVZ incorporado às nanopartículas reticuladas ou não reticuladas foram demonstradas em modelo de monocamadas de células Caco-2. A nano-compartmentalização do BVZ em nanopartículas reticuladas ou não promoveu a expressiva redução da angiogênese em modelo de membrana corioalantóica do embrião da galinha (CAM), demonstrando a potencialização da atividade anti-angiogênica do BVZ incorporado nas nanopartículas.

Palavras-chave: sistemas nanoestruturados; liberação cólon específica; polímeros naturais; goma gelana; amido retrogradado; sistemas mucoadesivos.

Mucosadhesive systems of gellan/retrograde starch intended for the colonic release of bevacizumab for the colorectal cancer treatment.**ABSTRACT**

Oral administration of protein nature drugs, such as bevacizumab (BVZ) enjoin great challenges, considering its physico-chemical instability against pH variable and enzymatic content in the upper segments of gastrointestinal (GIT). In the present work, oral nanocarriers based on gellan gum (GG) and retrograded starch (RS) were designed as a potential technological strategy for the effective protection of BVZ, as well as for the modulation of its physicochemical properties, of release and interaction with the biological interface, in order to achieve the colon-specific release of this protein origin drug. The starch retrogradation was exploited to suit its properties, such as solubility, swelling, rheological properties, mucoadhesiveness, enzyme resistance, according to the intended aim. The nanostructured systems were obtained by the polyelectrolytic complexation of the polymers with the BVZ, and the effect of the ionic cross-linking also was evaluated. The effects of the polymer blends (GG/AR), BVZ and aluminum chloride ($AlCl_3$) concentration on the mean diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) of the nanoparticles were evaluated using a factorial design (FD) 3^3 . Nanoparticles with average diameter between 191.7 and 629, 87 nm, reduced PDI (lower 0.51) and PZ higher than -20 mV were obtained. The cross-linking process led to the increase in particles diameter, which presented spherical shape. The BVZ incorporation efficiency was high (56.16% and 100%) and the absorption spectra in the infrared (IR) region evidenced that the interactions between the polymers and BVZ should be predominantly supramolecular. The secondary and tertiary structures maintenance of protein after the incorporation in the nanocarreadores was evidenced by analyzes of absorption spectroscopy IR region and by the intrinsic fluorescence spectroscopy. The BVZ thermal stability incorporated in the cross-linked or un-cross-linked nanoparticles was demonstrated by differential scanning microcalorimetry. The expressive modification of the mucin rheological behavior in the presence of the cross-linked or un-cross-linked nanoparticles showed the mucoadhesive properties of systems, so that the ionic cross-linking disturbed the mucoadhesion in acidic medium. The mucoadhesive hability associated to low BVZ release rates (< 38 % at pH 1.2 and < 31 % at pH 6.8) should favor the drug accumulation at the action site. The BVZ structural integrity after nanoparticles incubation in the dissolution media (0.1 N HCl pH 1.2 and 0.1 M phosphate buffer pH 6.8) was evidenced by circular dichroism analysis. The low permeability (P_{app} 0.5×10^{-6} cm.s⁻¹) and reduction of BVZ cytotoxicity incorporated into the cross-linked or non-crosslinked nanoparticles were demonstrated in a Caco-2 cell monolayer model. Nano-compartmentalization of BVZ into cross-linked nanoparticles or un-cross-linked promoted the expressive angiogenesis decrease in the chicken embryo chorioallantoic membrane model (CAM), demonstrating the anti-angiogenic activity potentialization of BVZ incorporated in the nanoparticles.

Keywords: nanostructured systems; colon specific release; natural polysaccharides; gellan gum; retrograded starch; mucoadhesive systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa mundial para o número de novos casos, em 2018, para todos os tipos de câncer, ambos os sexos e todas as idades.	8
Figura 2. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência do câncer de cólon e reto, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação.	9
Figura 3. Etapas de desenvolvimento do câncer.	10
Figura 4. Estágios de desenvolvimento do câncer colorretal.	11
Figura 5. Etapas envolvidas na angiogênese	12
Figura 6. Estrutura do Bevacizumabe.	16
Figura 7. Inibição VEGF pelo BVZ.	17
Figura 8. Anatomia do cólon.	20
Figura 9. Representação esquemática das nanoesferas e nanocápsulas poliméricas.	24
Figura 10. Nanopartículas obtidas por complexação polieletrólítica (A) e por reticulação iônica (B).	25
Figura 11: Representação esquemática das etapas de mucoadesão.	27
Figura 12. Estrutura química da GG nativa (A), acetilada (B) e desacetilada (C).	29
Figura 13. Estruturas da amilose e amilopectina.	31
Figura 14. Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas não reticuladas (A) e reticuladas (B).	42
Figura 15. Esquema ilustrativo da medida de resistência transepitelial (TEER) em monocamadas de células Caco-2, utilizadas nos estudos de permeabilidade.	56
Figura 16. Etapas da gelatinização e retrogradação da alta amilose (High amylose – Hylon VII).	60
Figura 17. Fotomicrografias dos grânulos de alta amilose antes e após a gelatinização, e ao final do processo de retrogradação, sob luz normal (A, C e E) e luz polarizada (B, D e F). ...	62
Figura 18. Gráfico de Debye apresentando a massa molar média dos polímeros.	65

Figura 19. PZ (média e DP) das dispersões de GG e AR em função do pH.	68
Figura 20. Representação esquemática da formação das nanopartículas.	72
Figura 21. Diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas (n=3).	73
Figura 22. Gráfico de distribuição de tamanho por intensidade de espalhamento de luz das proporções estudadas.	74
Figura 23. Potencial zeta das nanopartículas.	75
Figura 24. Gráfico de superfície de resposta (A, B e C) e de contorno (a, b e c) dos efeitos das concentrações de polímeros, fármaco e AlCl ₃ no diâmetro médio das nanopartículas reticuladas.	80
Figura 25: Gráfico de superfície de resposta (A, B e C) e de contorno (a, b e c) dos feitos das concentrações de polímeros, fármaco e AlCl ₃ no PdI.	82
Figura 26: Gráfico de superfície de resposta (A, B e C) e de contorno (a, b e c) dos efeitos das concentrações e polímeros, fármaco e AlCl ₃ no PZ.	84
Figura 27. Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão, representado pelas barras e pontos, respectivamente (A); e potencial zeta (B) de todas as nanopartículas reticuladas e não reticuladas.	87
Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas reticuladas e não reticuladas nos aumentos de 25,000x e 50,000x, respectivamente. Legendas A: NP1; B: NP1R1; C: NP1R2; D: NP2; E: NP2R1; F: NP2R2; G: NP3; H: NP3R1; I: NP3R2.	89
Figura 29. Distribuição granulométrica das nanopartículas reticuladas e não reticuladas.	91
Figura 30. Espectro de absorção na região do infravermelho do BVZ.	93
Figura 31. Espectros de absorção na região do infravermelho dos polímeros isolados (GG e AR) e misturas poliméricas GG/AR.	95
Figura 32. Espectros de absorção na região do infravermelho do BVZ, polímeros (GG e AR), misturas poliméricas (GG/AR) e todas as nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.	96
Figura 33. Cromatograma do BVZ (350 µg.mL ⁻¹) obtido pelo método cromatográfico proposto CLAE com detecção por fluorescência (λ excitação= 280 nm e λ emissão= 360 nm), em fase	

móvel ACN:H ₂ O (97:3).....	98
Figura 34. Sobreposição dos cromatogramas da mistura GG, AR e Al ³⁺ (A) e do BVZ (B) (25 µg.mL ⁻¹), obtidos em CLAE-fluorescência em 280 nm.	99
Figura 35. Curva analítica do BVZ obtida a partir do método cromatográfico proposto.	100
Figura 36. Localização do BVZ na rede estrutural das nanopartículas reticuladas.....	104
Figura 37. Formação da ligação amida.....	106
Figura 38. Segunda derivada dos espectros de FTIR do fármaco e amostras.	107
Figura 39. Espectros de fluorescência intrínseca do BVZ livre e incorporado nas nanopartículas reticuladas e não reticuladas.	109
Figura 40. Centro de massa espectral do BVZ livre e das nanopartículas reticuladas e não reticuladas.....	110
Figura 41. Curva de nanoDSC do BVZ em solução aquosa e das nanopartículas reticuladas e não reticuladas.	112
Figura 42. Curvas de DSC do BVZ, polímeros isolados (AR e GG) e mistura GG/AR.....	114
Figura 43. Curva de DSC das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.	117
Figura 44: Curvas de TG/DTG do BVZ, polímeros isolados e mistura polimérica GG/AR. polieletrólitos.	119
Figura 45. Curvas de TG/DTG das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.....	123
Figura 46: Espectros da varredura de tensão da mucina e das misturas nanopartículas/mucina em pH 1,2 e pH 6,8.....	126
Figura 47. Espectros de varredura de frequência da mucina e das misturas nanopartículas/mucina em pH 1,2 e 6,8.	128
Figura 48. Perfil de liberação do BVZ a partir das nanopartículas de GG/AR (reticuladas e não reticuladas) em HCl pH 1,2 (0-120 min).....	135
Figura 49. Perfil de liberação do BVZ a partir das nanopartículas de GG/AR (reticulada e não reticulada) em tampão fosfato pH 6,8 (0-240 min).	138
Figura 50: Espectro de dicroísmo circular do BVZ livre e após sua liberação das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas (A: pH 1,2 e B: pH 6,8).....	144

Figura 51. Viabilidade celular (%) na linhagem Caco-2, após 4h e 24h de incubação com BVZ livre, polímeros e nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.	147
Figura 52. Medidas de TEER obtidos para as monocamadas de células Caco-2 aos 10, 15 e 21 dias de cultivo em meio DMEM com pH 7,4.....	149
Figura 53. Esquema ilustrativo do ensaio de permeabilidade <i>in vitro</i>	150
Figura 54. Percentual de permeabilidade do BVZ em monocamadas de células Caco-2 a partir das nanopartículas reticuladas e não reticulada.....	151
Figura 55. Processo de Angiogênese por brotamento e intussusceptiva.....	154
Figura 56. Imagens adquiridas <i>in ovo</i> após aplicação no ED6 do experimento para o SF 0,9 % (controle negativo), BVZ (0,15 mg/mL e 0,35 mg/mL) (controle positivo), mistura GG/AR (1:1, v/v; 0,35 mg/mL), NP1, NP1R1, NP1R2 e NP3.	155
Figura 57. Distribuição da relação diâmetro/comprimento do grupo controle negativo (SF 0,9%) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.	157
Figura 58. Distribuição da relação diâmetro/comprimento da mistura polimérica (GG/AR) nos tempos 0, 24 e 48 horas.	158
Figura 59. Distribuição da relação diâmetro/comprimento do grupo controle positivo, BVZ 0,15 mg/mL (A) e 0,35 mg/mL (B), respectivamente, nos tempos 0, 24, 48 horas.	159
Figura 60. Distribuição da relação diâmetro/comprimento das nanopartículas (A: NP1; B: NP1R1; C: NP1R2 e D: NP3) nos tempos 0 e 24 horas.....	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções de GG/AR e BVZ exploradas para formação das nanopartículas.	40
Tabela 2. Níveis dos fatores selecionados e respostas avaliadas no PF completo 3^3	41
Tabela 3. Condições empregadas na metodologia analítica.	45
Tabela 4. Efeito das diferentes proporções polímeros: fármaco nos valores de diâmetro médio, Pdl e PZ das nanopartículas formadas.....	71
Tabela 5. Fatores ou variáveis independentes, com seus valores codificados, e as respostas aplicadas no PF completo 3^3	78
Tabela 6. Efeitos principais, quadráticos e de interação das variáveis analisadas no PF completo 3^3	79
Tabela 7. Composição e nomenclatura das nanopartículas e das nanopartículas reticuladas selecionados com o PF completo 3^3	85
Tabela 8. Diâmetro médio hidrodinâmico (nm), Pdl e PZ das nanopartículas reticuladas e não reticuladas (em pH 6,2), selecionadas com PF completo 3^3	86
Tabela 9. Valores de diâmetro médio das nanopartículas reticuladas e não reticuladas	90
Tabela 10. Bandas características do BVZ.	94
Tabela 11. Adequabilidade do sistema cromatográfico: parâmetros avaliados.....	97
Tabela 12: Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva. ..	100
Tabela 13. Resultados obtidos pelo teste de precisão intra-corridas.	101
Tabela 14. Resultados obtidos pelo teste de precisão inter-corridas.	101
Tabela 15. Valores de exatidão.....	102
Tabela 16: Valores de robustez.....	103
Tabela 17. Eficiência de incorporação nanopartículas reticuladas e não reticuladas.	103
Tabela 18. Dados espectrais de fluorescência do BVZ, nanopartículas reticuladas e não-reticuladas (n=3).....	111
Tabela 19. Parâmetros calorimétricos da GG, AR, BVZ e das nanopartículas reticuladas e não-	

reticuladas.....	115
Tabela 20. Percentual de perda de massa dos polímeros isolados (GG e AR), mistura GG/AR (1:1), BVZ, nanopartículas reticulada e não reticuladas	120
Tabela 21. Valores de stress crítico, G' e G'' do teste oscilatório da mucina e das misturas nanopartículas/mucina (frequência 1 Hz).....	127
Tabela 22. Módulo de interação ($\Delta G'$) das misturas nanopartículas/mucina (Frequência 1 Hz).	133
Tabela 23. Percentual de BVZ liberado em meio ácido (pH 1,2) e em tampão fosfato (pH 6,8) (n=3).	136
Tabela 24. Coeficientes de correlação e parâmetros matemáticos dos dados de liberação do BVZ a partir das nanopartículas em HCl 0,1 M (pH 1,2), para os diferentes modelos matemáticos.....	139
Tabela 25. Coeficientes de correlação e parâmetros matemáticos dos dados de liberação do BVZ a partir das nanopartículas em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), para os diferentes modelos matemáticos.....	140
Tabela 26. Valores de coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}).....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

- [λ] – centro de massa espectral
- A2 – Segundo coeficiente virial
- Al³⁺ - íons alumínio
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AR - amido retrogradado
- ATR – Refletância total atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*)
- BVZ - bevacizumabe
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
- DC – dicroísmo circular
- DLS – espalhamento de luz dinâmica (do inglês, *dynamic light scattering*)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DSC – calorimetria exploratória diferencial (do inglês, *differential scanning calorimeter*)
- DTG – Termogravimetria Derivada
- EI % - eficiência de incorporação
- FTIR - espectroscopia de absorção na região do IV por transformações de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
- GG – goma gelana
- GG/AR – mistura de goma gelana e amido retrogradado
- IgG – Imunoglobulina G
- IV - infravermelho
- LD – limite de detecção
- LQ – limite de quantificação
- mAbs – do inglês, *monoclonal antibodies*
- MET – microscopia eletrônica de transmissão
- PdI – índice de polidispersão
- PF - planejamento fatorial
- PLGA - poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
- PZ - potencial zeta
- SLS – espalhamento de luz estático (do inglês, *static light scattering*)
- TFA - ácido trifluoroacético

TG – termogravimetria

TGI – trato gastrintestinal

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, vascular endothelial growth fator)

VEGF-A – fator de crescimento endotelial vascular do tipo A (do inglês, vascular endothelial growth fator type A)

VEGFR-1 - receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1 (do inglês, Vascular endothelial growth factor receptor-1)

VEGFR-2 - receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (do inglês, Vascular endothelial growth factor receptor-1)

λ_{\max} – comprimento de onda de máxima absorção

ORGANIZAÇÃO DA TESE

Introdução

Fundamentação teórica

- Aspectos epidemiológicos do câncer colorretal
- Desenvolvimento do câncer colorretal
- Angiogênese tumoral
- Bevacizumabe
- Sistemas para liberação cólon-específica de fármacos
- Nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos
- Nanopartículas poliméricas mucoadesivas
- Polímeros

Objetivos

Material e métodos

- Obtenção e caracterização dos polímeros
- Desenvolvimento de partículas reticuladas e não reticuladas
- Caracterização da nanopartículas reticuladas e não reticuladas
- Validação do método analítico para quantificação do BVZ
- Eficiência de incorporação (%)
- Análises da estrutura conformacional do BVZ
- Análises térmicas (DSC e TG/DTG)
- Testes oscilatórios dinâmicos para avaliação das propriedades mucoadesivas
- Estudo de dissolução do BVZ
- Análise da estrutura secundária do BVZ por difração circular após incubação do fármaco
- Ensaios celulares (monocamada de células Caco- 2)
- Análise da atividade anti-angiogênica utilizando membrana corialantóica de ovo de galinha
- Análise estatística

Resultados e discussão

- Obtenção e caracterização físico-química dos polímeros
- Desenvolvimento das nanopartículas reticuladas e não reticuladas
- Caracterização físico-química das nanopartículas reticuladas e não reticuladas
- Validação do método analítico para quantificação do BVZ
- Eficiência de incorporação (%)
- Estudo da estrutura conformacional do BVZ
- Análises térmicas (DSC e TG/DTG)
- Avaliação das propriedades mucoadesivas
- Estudo de dissolução do BVZ
- Análise da estrutura secundária do BVZ por difração circular após incubação do fármaco
- Ensaios celulares (monocamada de células Caco- 2)
- Análise da atividade anti-angiogênica utilizando membrana corialantóica de ovo de galinha

Conclusões

Referências bibliográficas

Anexos

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS	V
EPÍGRAFE.....	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
2.1 Aspectos epidemiológicos do câncer colorretal	7
2.2 Desenvolvimento do câncer colorretal	9
2.3 Angiogênese tumoral.....	12
2.4 Bevacizumabe.....	15
2.5 Sistemas para liberação cólon-específica de fármacos.....	19
2.5.1 Nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos.....	21
2.5.2 Nanopartículas poliméricas mucoadesivas	26
2.6 Polímeros.....	28
2.6.1 Goma gelana	28
2.6.2 Amido Retrogradado	30
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL	35
4.1.1 Principais matérias-primas e reagentes.....	35
4.1.2 Cultura celular	35

4.1.3 Principais equipamentos	35
4.2 MÉTODOS.....	36
4.2.1 Obtenção e caracterização físico-química dos polímeros.....	36
4.2.1.1 Retrogradação do amido	36
4.2.1.2 Birrefringência das dispersões de amido	36
4.2.1.3 Determinação da massa molar dos polímeros utilizando espalhamento de luz estático	37
4.2.2 Desenvolvimento de nanopartículas reticuladas e não reticuladas.....	38
4.2.2.1 Preparo da dispersão de BVZ	38
4.2.2.2 Preparo das dispersões de goma gelana e amido retrogradado.....	38
4.2.2.3 Análise do PZ das dispersões poliméricas em função do pH	38
4.2.2.4 Análise da influência das proporções de polímeros e fármaco na formação das nanopartículas	39
4.2.2.5 Planejamento fatorial completo 3 ³ para obtenção das nanopartículas reticuladas	40
4.2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas reticuladas e não reticuladas	42
4.2.3.1 Análise do diâmetro médio hidrodinâmico e PDI	42
4.2.3.2 Análise do PZ das nanopartículas.....	43
4.2.3.3 Análise da morfologia e tamanho das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG).....	43
4.2.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) com refletância total atenuada (ATR).	43
4.2.4 Validação da metodologia analítica para quantificação de BVZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	44
4.2.4.1 Conformidade do método cromatográfico.....	45
4.2.4.2 Especificidade/Seletividade.....	45
4.2.4.3 Linearidade	46
4.2.4.4 Precisão.....	46

4.2.4.5 Exatidão	46
4.2.4.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	47
4.2.4.7 Robustez	47
4.2.5 Eficiência de incorporação (EI %).....	47
4.2.6 Análises da estrutura conformacional do bevacizumabe.....	48
4.2.6.1 Análise da estrutura secundária do BVZ por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	48
4.2.6.2 Análise da estrutura terciária do BVZ por espectroscopia de fluorescência.....	49
4.2.6.3 Análise da desnaturação térmica do BVZ por microcalorimetria Exploratória Diferencial	49
4.2.7 Análises térmicas	50
4.2.7.1 Análises de DSC e TG/DTG	50
4.2.8 Estudo reológico para avaliação das propriedades mucoadesivas.....	50
4.2.8.1 Preparo das amostras	50
4.2.8.2 Ensaios oscilatórios dinâmicos.....	50
4.2.9 Estudo de dissolução do BVZ	52
4.2.9.1 Determinação do perfil de liberação in vitro do BVZ.....	52
4.2.9.2 Análise da cinética de liberação do fármaco	52
4.2.10 Análise da estrutura secundária do BVZ por Dicroísmo Circular após a incubação em meio ácido (pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,8).....	52
4.2.11 Ensaios Celulares.....	53
4.2.11.1 Cultivo da célula Caco-2	54
4.2.11.2 Ensaios de Viabilidade Celular em monocamadas de células Caco-2	54
4.2.11.3 Resistência elétrica transepitelial (TEER).....	55
4.2.11.4 Permeabilidade intestinal in vitro em monocamadas de células Caco-2.....	55
4.2.12 Análise da atividade anti-angiogênica utilizando modelo membrana corioalantóica (CAM) em ovos de galinha	56

4.2.13 Análise estatística	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Obtenção e caracterização físico-química dos materiais poliméricos	59
5.1.1 Retrogradação do amido	59
5.1.2 Birrefringência das dispersões de alta amilose, amido gelatinizado e amido retrogradado	61
5.1.3 Determinação da massa molar média dos polímeros utilizando espalhamento de luz estático (SLS)	63
5.2 Desenvolvimento das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas	67
5.2.1 Estudos para otimização das condições para obtenção das nanopartículas	67
5.2.1.1 Análise da influência do pH na formação dos sistemas	67
5.2.1.2 Análise da influência da proporção de polímero e fármaco no diâmetro médio hidrodinâmico, PDI e PZ das nanopartículas	69
5.2.2 Preparo das nanopartículas reticuladas utilizando planejamento fatorial completo 3 ³ ...	76
5.3 Caracterização físico-química das nanopartículas reticuladas e não reticuladas	85
5.3.1 Análise de tamanho, PDI e potencial zeta	85
5.3.2 Análise da morfologia e tamanho das nanopartículas reticuladas e não reticuladas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)	88
5.3.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) com refletância total atenuada (ATR) das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas	92
5.4 Validação da metodologia analítica para quantificação de BVZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	96
5.4.1 Conformidade do método cromatográfico	97
5.4.2 Especificidade/Seletividade	98
5.4.3 Linearidade	99
5.4.4 Precisão	100
5.4.5 Exatidão	102
5.4.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	102

5.4.7 Robustez	102
5.5 Avaliação da eficiência de incorporação (<i>EI</i> %)	103
5.6 Estudos da estrutura conformacional do BVZ após obtenção das nanopartículas e nanopartículas reticuladas.....	105
5.6.1 Análise da estrutura secundária do BVZ por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	105
5.6.2 Análise da estrutura terciária do BVZ por espectroscopia de fluorescência	108
5.6.3 Análise da conformação estrutural do BVZ por microcalorimetria exploratória diferencial (nanoDSC).....	111
5.6.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	113
5.6.5 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG).....	118
5.7 Avaliação das propriedades reológicas e mucoadesivas	124
5.7.1 Testes oscilatórios dinâmicos	125
5.7.2 Cálculo do módulo de interação	132
5.8 Estudo de dissolução do BVZ	133
5.8.1 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do BVZ	133
5.8.2 Análise dos mecanismos de liberação “ <i>in vitro</i> ” do BVZ	139
5.9 Análise da estrutura secundária do BVZ por Dicroísmo Circular após a incubação em meio ácido (pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,8).....	142
5.10 Ensaio em células.....	146
5.10.1 Ensaio de viabilidade celular	146
5.10.2 Avaliação da integridade da monocamada de células Caco-2 por meio da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)	148
5.10.3 Permeabilidade intestinal <i>in vitro</i>	149
5.11 Avaliação da atividade anti-angiogênica do BVZ em membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha	153
6. CONCLUSÕES	163

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
ANEXOS.....	204

1. INTRODUÇÃO

O câncer representa, atualmente, um dos grandes problemas mundiais de saúde pública, cuja incidência vem crescendo em uma velocidade preocupante nas últimas décadas. O aumento no número de casos em função do envelhecimento populacional é alarmante. Com base nas pesquisas da GLOBOCAN 2018, um projeto da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC do inglês, *International Agency for Research on Cancer*) que avalia estimativas de incidência e mortalidade por câncer, mais de 1,8 milhões de novos casos de câncer colorretal e 881.000 mortes estavam previstas para 2018, o que representa 1/10 casos e mortes por câncer (BRAY et al., 2018).

O câncer colorretal ocupa a terceira colocação entre os tipos de câncer mais frequentemente diagnosticados mundialmente, entre homens e mulheres. Pesquisas realizadas pela *American Cancer Society* (2018) revelaram que o câncer colorretal, considerado o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos, é também uma das principais causas de morte por câncer entre homens e mulheres. Segundo essa agência, em 2018, 97.220 pessoas foram diagnosticadas com o câncer de cólon e 43.030 com câncer de reto e 50.630 mortes foram causadas pelo câncer colorretal (GELBAND et al., 2015; SOCIETY, 2018).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), as estimativas para biênio 2018 - 2019 são de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, dentre eles o câncer de cólon e reto, que para cada ano (2018 e 2019), devem atingir 17.380 novos casos em homens e 18.980 em mulheres. Esse cenário evidencia a gravidade do problema e a urgente necessidade de busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença (INCA, 2018).

A abordagem do câncer como um problema de saúde pública levou o Ministério da Saúde a estabelecer medidas de controle do câncer implementando, desde o final de 2005, a Política Nacional de Atenção Oncológica (PNAO), que abrange ações de promoção, prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e cuidados paliativos (PARADA et al., 2008).

A prevenção e controle do câncer representa, atualmente, um dos grandes desafios enfrentados pelos sistemas de saúde pública. O registro de novos casos e as estimativas são fundamentais para o planejamento de ações de controle e prevenção do câncer de acordo com cada região. A descrição da distribuição dos tipos de câncer mais incidentes tem sido uma das principais estratégias utilizadas pelo INCA, com o propósito de fortalecer a vigilância do câncer no Brasil e, conseqüentemente, favorecer a implementação de ações e programas de prevenção e controle da doença, dentre eles programas de orientação à população quanto aos fatores de

riscos, programas para melhoria na qualidade do atendimento nos centros oncológicos e integração da assistência oncológica com qualidade no Brasil, bem como qualificação dos profissionais da área (INCA, 2018).

Por várias décadas a quimioterapia endovenosa tem sido o recurso terapêutico mais utilizado para tratamento de diversos tipos de câncer. Muitas vezes, dependendo do grau de disseminação da doença, é necessária a combinação da quimioterapia a outras modalidades terapêuticas, como radioterapia e a ressecção cirúrgica. A escolha do esquema de tratamento vai depender da localização e estágio de desenvolvimento da doença (ASLAN et al., 2013; MISHRA et al., 2013; TOLOUDI et al., 2015). No entanto, cada uma dessas alternativas apresenta limitações e comprometem significativamente a qualidade de vida do paciente.

Na ressecção cirúrgica, sérias complicações pós-operatórias, potencialmente fatais, podem ocorrer, como infecção cirúrgica, deiscência de anastomose (abertura da sutura entre dois segmentos intestinais), abscesso intra-abdominal, alteração transitória da motilidade gastrintestinal e sangramento (KIRCHHOFF; CLAVIEN; HAHNLOSER, 2010). A radioterapia, por outro lado, apesar de representar um tratamento localizado, agrega como desvantagem o fato da irradiação direta sobre o tecido epitelial provocar importantes alterações na pele, como queimaduras e lesões cutâneas. Além disso, outros efeitos indesejáveis como náuseas, vômitos, diarreia, incontinência intestinal, cansaço e principalmente, irritação da mucosa retal e da bexiga podem ser observados.

No caso da quimioterapia convencional, administrada pela via endovenosa, a falta de especificidade/seletividade dos agentes antineoplásicos, a inevitável distribuição do fármaco para órgão e/ou tecidos saudáveis e a predisposição das células tumorais tornarem-se mais resistentes, levando à administração de altas doses, resultando na elevada toxicidade (ESTANQUEIRO et al., 2015; JAIN et al., 2010; OLIVEIRA, 2014; ORIVE et al., 2005; SINHA et al., 2006; WANG; HO; LIM, 2010) e imunossupressão (EHRKE, 2003).

Por outro lado, a terapia antineoplásica por via oral pode representar uma alternativa para o tratamento em domicílio, que ofereça uma maior comodidade e segurança ao paciente. Além disso, a eliminação da necessidade de permanência do paciente no centro de quimioterapia para administração endovenosa agrega importante vantagem econômica, reduzindo os custos do tratamento para o sistema de saúde e/ou para o paciente (OLIVEIRA; QUEIROZ, 2012). Entretanto, a existência dos efeitos colaterais sistêmicos, infecções, náuseas, vômitos, diarreias, além da gastrotoxicidade causados pelos agentes antineoplásicos quando administrados por via oral não devem ser negligenciados.

O bevacizumabe (BVZ), um mAb recombinante humanizado do tipo IgG, tem seu uso muito bem estabelecido na quimioterapia. Disponível comercialmente na forma de solução para infusão endovenosa (Avastin[®]), o BVZ foi aprovado pelo FDA, do inglês *Food and Drug Administration*, em 2004 como fármaco de primeira linha no tratamento do câncer colorretal (FERRARA et al., 2004; SASICH; SUKKARI, 2012) e, em 16 de maio de 2005, foi registrado (nº registro 101000637) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2005; FERREIRA, 2014). A administração do BVZ isolado ou em combinação com outros agentes antineoplásicos tem conduzido a importantes avanços na terapia antitumoral, mostrando consideráveis benefícios que se sobrepõe à toxicidade (FERRARA et al., 2004; FERRARA; HILLAN; NOVOTNY, 2005; PAVLIDIS; PAVLIDIS, 2013).

Alvo de intensa pesquisa nos últimos anos, o BVZ representa uma importante alternativa de tratamento para uma ampla variedade de tumores sólidos. Seu principal alvo é a angiogênese, ativada por fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), atuando no bloqueio da ligação entre a isoforma VEGF-A e seus receptores de tirosina quinase VEGFR-1 e VEGFR-2 (TAUGOURDEAU-RAYMOND; ROUBY; DEFAULT; JEAN-PASTOR, 2012).

Estudos recentes têm evidenciado que a terapia anti-angiogênica pode melhorar substancialmente a sobrevivência global (tempo decorrido entre o diagnóstico e o óbito) e a sobrevivência livre de progressão da doença em pacientes com câncer colorretal (GARCIA et al., 2008; GIANTONIO et al., 2007; GROTHEY et al., 2008; GUSTAVSSON et al., 2015; HURWITZ et al., 2004; MA; WAXMAN, 2008; MI et al., 2015; SALTZ et al., 2008).

Apesar do BVZ apresentar um perfil aceitável de risco-benefício aos pacientes em tratamento do câncer, os efeitos adversos relacionados a administração endovenosa, como hipertensão, tromboembolismo venoso, disfunção ventricular esquerda, infarto do miocárdio, proteinúria, hemorragia, e principalmente a perfuração gastrointestinal, não devem ser ignorados (SASICH e SUKKARI, 2012). Nesse sentido, o desenvolvimento de sistemas de liberação inovadores para administração oral, capazes de promover o controle temporal e/ou espacial da liberação do BVZ, representa uma alternativa racional para a otimização da eficácia terapêutica e redução dos efeitos colaterais.

Dentro do contexto da nanotecnologia farmacêutica, as possibilidades de vetorização, controle das taxas de liberação e proteção do fármaco ou biomolécula contra os ataques enzimáticos nas porções superiores do TGI tornam os nanocarreadores sistemas altamente promissores para veiculação de fármacos destinados ao tratamento de diversas tipos de doenças

do TGI, como por exemplo, o câncer. As reduzidas dimensões desses sistemas são favoráveis à sua penetração no muco, aderido ao epitélio intestinal, o que contribui para o aumento do tempo de residência e conseqüente acúmulo do fármaco no local de ação e/ou absorção, melhorando a eficácia da terapia local antitumoral (HUA et al., 2015).

Adicionalmente, o desenvolvimento de sistemas de liberação para veiculação de biomoléculas e anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês *monoclonal antibodies*) como BVZ para terapia ou diagnóstico de doenças, representa um grande desafio, particularmente, considerando-se a via oral de administração, já que essas biomacromoléculas apresentam grande instabilidade físico-química frente as condições fisiológicas variáveis ao longo do TGI, como pH e conteúdo enzimático, bem como em determinadas condições envolvidas nas diferentes etapas de um processo produtivo (ex. elevadas temperaturas, uso solventes orgânicos) (SCHWEIZER; SCHONHAMMER; et al., 2013).

A utilização de polissacarídeos de origem natural no delineamento de nanocarreadores para a veiculação de fármacos e/ou biomoléculas pode agregar importantes vantagens devido a atoxicidade, biocompatibilidade e ampla disponibilidade e baixo custo desses materiais (ALVAREZ-LORENZO et al., 2013; BHARDWAJ et al., 2000; KULKARNI et al., 2011; SINHA; KUMRIA, 2001). No entanto, polissacarídeos na sua forma nativa possuem propriedades físico-químicas inadequadas para fins específicos, como por exemplo, problemas relacionados a solubilidade, intumescimento, propriedades reológicas, mucoadesividade, resistência enzimática, dentre outros. Nesse sentido, processos de reticulação iônica e/ou covalente têm demonstrado papel determinante na modulação das propriedades dos sistemas de liberação obtidos a partir de polissacarídeos naturais modificados (BONI et al., 2018; BONI et al., 2016; CARBINATTO et al., 2012; CARBINATTO et al., 2014; CARBINATTO et al., 2016; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN et al., 2014; OLIVEIRA; FERRARI; et al., 2010; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; SILVA; et al., 2018; PREZOTTI et al., 2014; RECIFE et al., 2017; SOARES et al., 2013).

Misturas de polissacarídeos mucoadesivos, seletivamente degradáveis pela microflora colônica, tem sido exploradas com sucesso por nosso grupo de pesquisa para o delineamento de sistemas para liberação cólon específica de fármacos. Tais associações tem permitido a modulação das propriedades físico-químicas (hidrofilica, potencial zeta, capacidade de intumescimento, degradabilidade enzimática, adesividade) e das propriedades de liberação (prolongada, retardada, sítio-específica) dos sistemas obtidos com esses materiais (BONI et al., 2018; BONI et al., 2016; CARBINATTO et al., 2012; CARBINATTO et al., 2014;

CARBINATTO et al., 2016; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN et al., 2014; OLIVEIRA; FERRARI; et al., 2010; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; SILVA; et al., 2018; PREZOTTI et al., 2014; RECIFE et al., 2017; SOARES et al., 2013).

O amido, um polissacarídeo natural atóxico, biodegradável e biocompatível, tem sido amplamente empregado na indústria alimentícia e farmacêutica (DENARDIN; SILVA, 2009; DONA et al., 2010; KULKARNI et al., 2011; OLIVEIRA CARDOSO; CURY; et al., 2017; PARAGINSKI et al., 2014; SINGH et al., 2003). Todavia, o amido nativo não apresenta propriedades físico-químicas adequadas (por exemplo, elevada solubilidade em meio aquoso) para determinadas aplicações, e por isso, modificações físicas, químicas ou enzimáticas são realizadas com o propósito de modificar/adequar suas propriedades (solubilidade, estabilidade, textura, a capacidade adesiva) a aplicações específicas (ZAVAREZE; DIAS, 2011).

A modificação física do amido nativo, através da retrogradação, permite obter elevadas quantidades de amido resistente tipo 3, uma fração do amido que escapa da digestão enzimática nos segmentos superiores do TGI, a qual apresenta baixa solubilidade em meio aquoso e é seletivamente degradada pela microbiota colônica, características importantes que fazem desse material um potencial candidato para aplicação em sistemas de liberação cólon específica (CHUNG; LIM; LIM, 2006; HARALAMPU, 2000; HTOON et al., 2010; THOMPSON, 2000).

A goma gelana (Kelcogel[®]), um exopolissacarídeo aniônico hidrofílico linear obtido pela da fermentação pelo microrganismo *Sphingomonas elodea* (GIAVASIS; HARVEY; MCNEIL, 2000), tem sido explorada no delineamento de sistemas de liberação controlada devido a sua habilidade em formar redes estruturais fortes na presença de cátions mono, di ou trivalentes (AGNIHOTRI; JAWALKAR; AMINABHAVI, 2006; BABU et al., 2010; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; PATIL et al., 2006; PREZOTTI et al., 2014; RAJINIKANTH; MISHRA, 2007). Sua reconhecida propriedade mucoadesiva agrega importante vantagem aos sistemas de liberação, pois favorece a interação biológica com a mucosa do TGI (LEE; PARK; ROBINSON, 2000; NARKAR et al., 2010; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

Em recente trabalho de nosso grupo de pesquisa, hidrogéis e micropartículas a base de GG e AR foram obtidos com sucesso por meio da técnica de geleificação ionotrópica, utilizando-se AlCl₃, e pela dupla reticulação, com AlCl₃ e glutaraldeído. Os resultados obtidos revelaram a elevada resistência enzimática e capacidade mucoadesiva dos sistemas. Além disso,

as reduzidas taxas de liberação do fármaco em meio ácido e o significativo controle da liberação em tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,8 indicaram o potencial do sistema para liberação cólon específica de fármacos (CARDOSO, 2014).

A utilização das técnicas de complexação polieletrólítica, entre os poliânions GG e AR e o policátion BVZ, associada a reticulação iônica, utilizando-se cloreto de alumínio (cátions Al^{3+}) para obtenção de nanocarreadores, representam vantagens tecnológicas, uma vez que o processo ocorre em condições reacionais amenas, sem a utilização de solventes orgânicos e elevadas temperaturas, além de serem técnicas relativamente simples, de baixo custo e fácil execução.

Com base nos fatos expostos, o desenvolvimento de nanocarreadores orais, com propriedades mucoadesivas, baseados em GG e AR representa uma estratégia tecnológica promissora para a liberação cólon específica do BVZ, considerando a necessidade de proteção contra a degradação/desnaturação ao longo do TGI. A capacidade mucoadesiva dos sistemas devem favorecer a interação biológica com tecido tumoral.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos epidemiológicos do câncer colorretal

Câncer, neoplasia ou tumor maligno são termos sinônimos que denotam um grupo heterogêneo de doenças malignas em que as células normais sofrem mutações em seu material genético devido a estímulos agressivos internos e/ou externos ao organismo, resultando no crescimento desordenado e acúmulo de células anormais, ou com defeito genético, originando o tumor. Essas células apresentam elevada capacidade de invadir outras regiões do corpo, desenvolvendo as chamadas metástases. Na maioria das vezes, o diagnóstico e o tratamento do câncer ocorre tardiamente, quando as metástases já foram estabelecidas (ESTANQUEIRO et al., 2015; KOZOVSKA; GABRISOVA; KUCEROVA, 2014; LABIANCA et al., 2010).

O câncer colorretal possui relevância epidemiológica em nível mundial e, normalmente, verifica-se uma grande variação geográfica de sua incidência, com taxas mais elevadas nos países mais desenvolvidos, em comparação aos países subdesenvolvidos (BRAY et al., 2018; CENTER; JEMAL; WARD, 2009), provavelmente devido aos maus hábitos alimentares, como consumo em excesso de carnes vermelhas e processadas, baixa ingestão de frutas, legumes e verduras, alta prevalência de obesidade e sobrepeso, inatividade física, consumo de álcool e tabagismo (INCA, 2018).

Segundo dados da GLOBOCAN 2018, baseados em estudos estatísticos realizados pela agência da Organização Mundial de Saúde, Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), mais de 1,8 milhões de novos casos de câncer colorretal ocorreram este ano (Figura 1), sendo 881.000 mortes ocorreram nesse mesmo período. Entre os diferentes tipos de neoplasias malignas, o câncer colorretal ocupa o terceiro lugar em termos de incidência e o segundo em termos de mortalidade (BRAY et al., 2018).

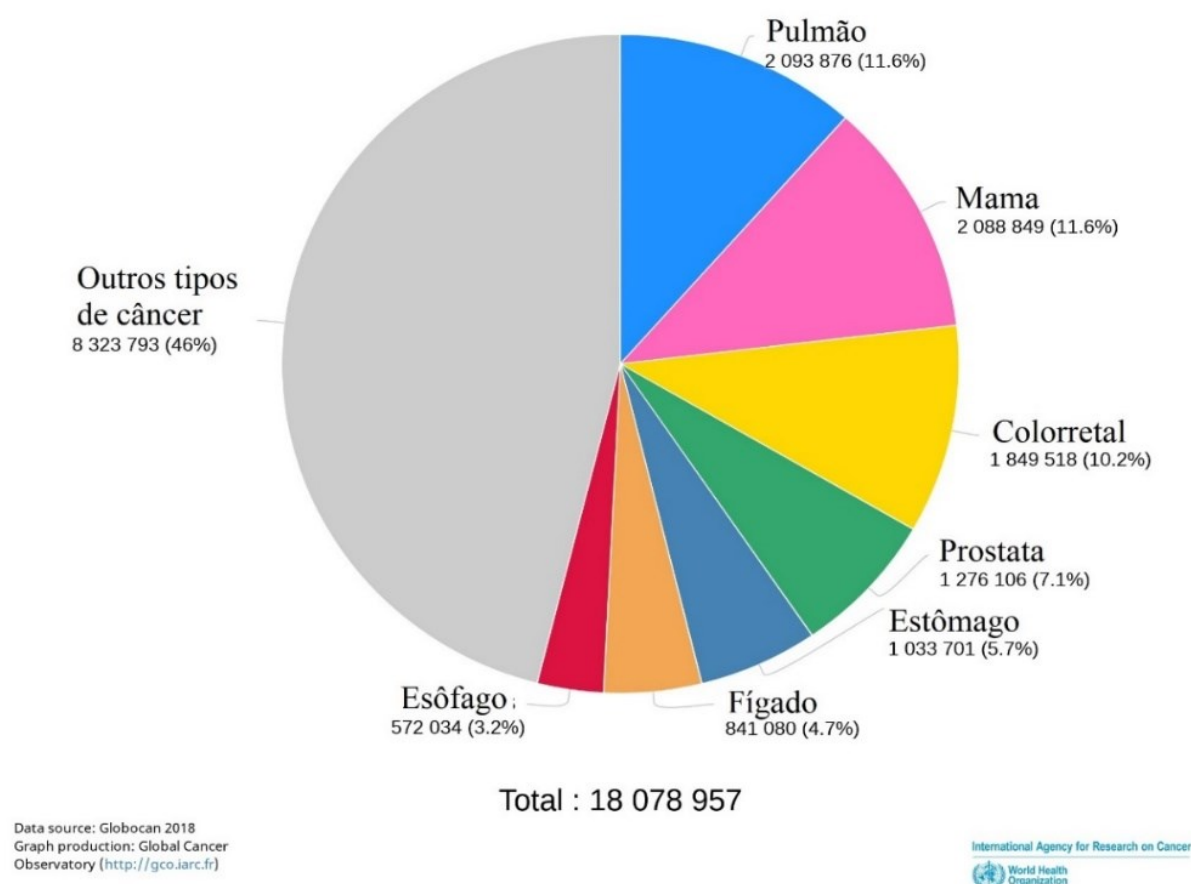


Figura 1. Estimativa mundial para o número de novos casos, em 2018, para todos os tipos de câncer, ambos os sexos e todas as idades.

Fonte: Organização Mundial de Saúde. Disponível em <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>. Acesso em 08/01/2019.

No Brasil, para os anos do biênio 2018-2019 as estimativas foram de 17.380 e 18.980 novos casos da doença para homens e mulheres, respectivamente, o que representa um risco de 16,83 novos casos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. Para a população masculina, é considerado o segundo tipo de câncer mais frequente na Região Sudeste (23,29/100 mil) e o terceiro nas Regiões Sul (22,17/100 mil) e Centro-Oeste (16,95/100 mil). Em contrapartida, nas Regiões Nordeste (7,98/100 mil) e Norte (4,97/100 mil) ocupa a quarta posição. Para a população feminina, é o segundo mais frequente nas Regiões Sudeste (23,86/100 mil) e Sul (22,92/100 mil); enquanto nas Regiões Centro-Oeste (17,98/100 mil), Nordeste (9,52/100 mil) e Norte (7,38/100 mil) é o terceiro tipo de câncer mais frequente (Figura 2) (INCA, 2018).

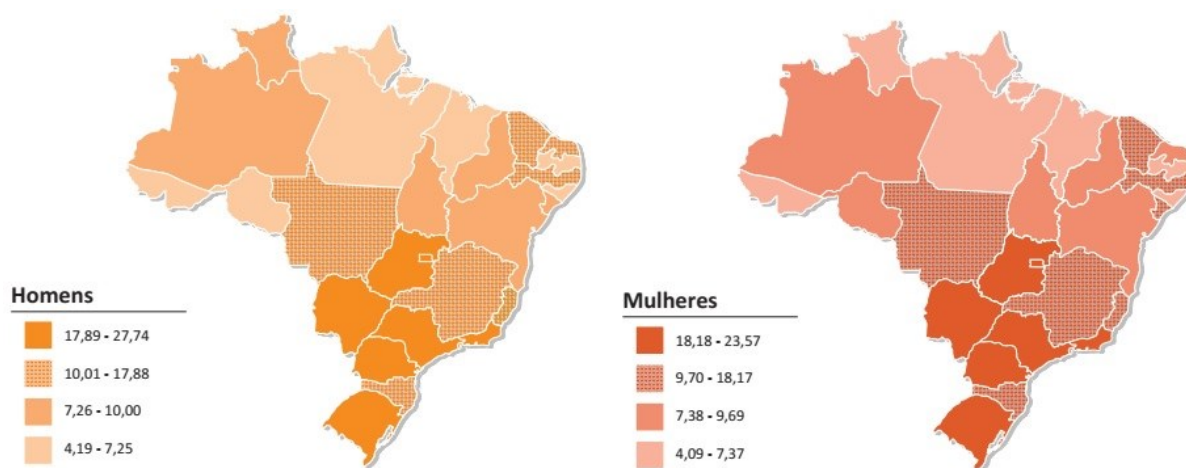


Figura 2. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência do câncer de cólon e reto, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação.

Fonte: Adaptado de: INCA, 2018.

2.2 Desenvolvimento do câncer colorretal

A carcinogênese (processo de formação do câncer) ocorre a partir de alterações genéticas em duas classes de genes especiais presentes em células normais, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes a princípio estão inativos em células normais e são responsáveis pela regulação natural da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Quando ativados, esses proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis por transformar células normais em malignas. Por outro lado, os genes supressores de tumor (anti-oncogenes) são responsáveis pela regulação e/ou inibição da multiplicação de células anormais ou de células que apresentem algum defeito no material genético (ALBERTS et al., 2010). A ativação dos proto-oncogenes concomitantemente à inativação dos genes supressores de tumor são os principais responsáveis pelo desenvolvimento tumoral (LODISH et al., 1995) e esse processo pode ser induzido por agentes carcinogênicos internos (predisposição genética) ou externos (ligados ao meio ambiente e aos maus hábitos e costumes socioculturais) ao organismo (ALBERTS et al., 2010).

A carcinogênese é um processo complexo e envolve três estágios: a iniciação, promoção, progressão (Figura 3) (SIDDIQUI et al., 2015).

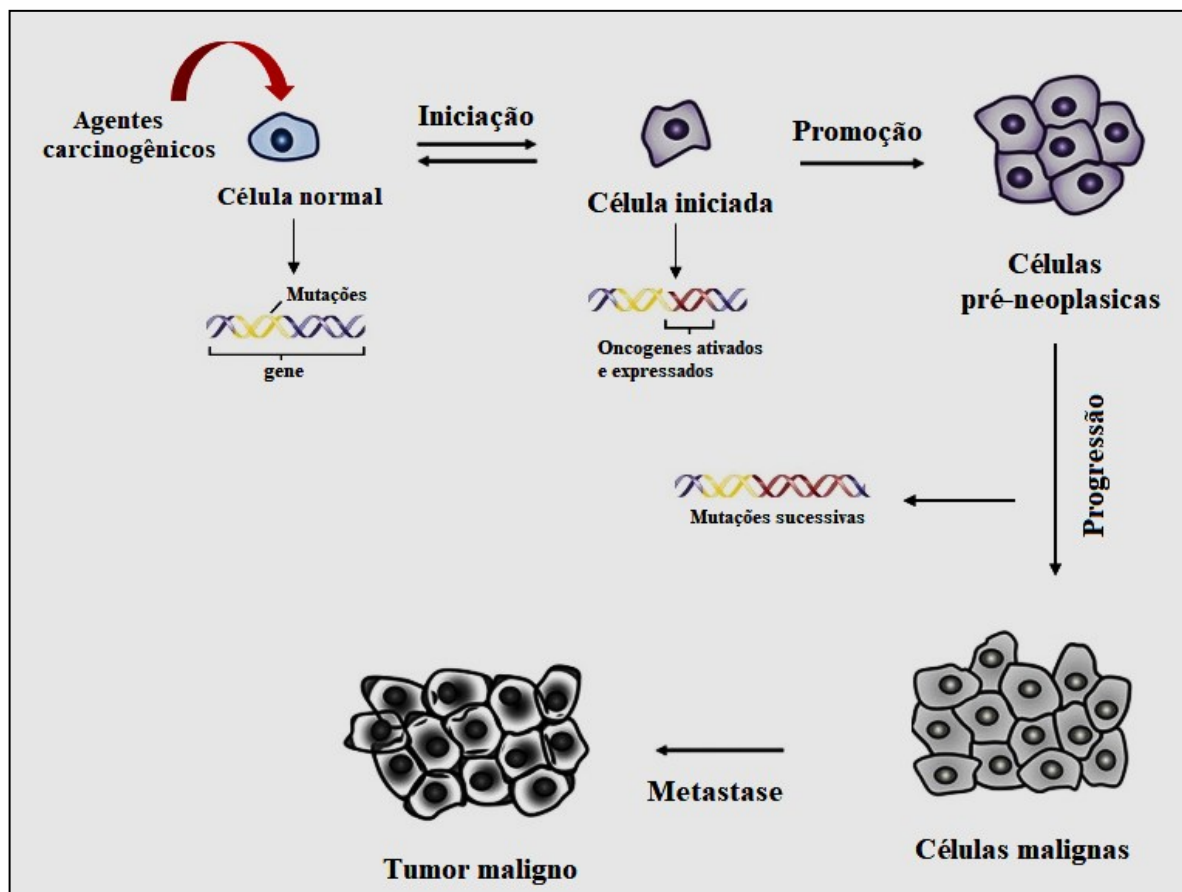


Figura 3. Etapas de desenvolvimento do câncer.
Fonte: Adaptado de SIDDIQUI et al., 2015.

Na iniciação as células são frequentemente expostas aos agentes carcinogênicos que promovem alterações permanentes no DNA (mutações), enquanto a promoção, considerada um processo relativamente longo e reversível, baseia-se na proliferação ativa e no acúmulo das células pré-neoplásicas ou precursoras do câncer. Nesse período é possível reverter o processo através da utilização de agentes quimioterápicos e alterar as taxas de crescimento dessas células (SIDDIQUI et al., 2015).

A progressão representa a fase final de transformação neoplásica, onde ocorrem mudanças genéticas e fenotípicas, bem como a proliferação descontrolada e progressiva das células tumorais. Nessa fase, as células podem sofrer novas e sucessivas mutações ampliando seu potencial invasivo e metastático (SIDDIQUI et al., 2015). Em síntese, uma única célula tumoral maligna é capaz de se replicar em uma taxa muito maior que as células normais e, a partir de ciclos sucessivos de mutações, evoluir para uma massa tumoral contendo células mais resistentes e capazes de escapar dos mecanismos de defesa do organismo (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004).

Finalmente, a disseminação das células malignas a partir do tumor primário para outros

órgãos e tecidos mais distantes ocorre, basicamente, através do destacamento das células tumorais e sua entrada para o sistema circulatório e linfático. Uma vez na corrente sanguínea, essas células são capazes de escapar das células de defesa do sistema imune (macrófagos), extravasando dos vasos e capilares para os tecidos adjacentes, desenvolvendo as chamadas metástases (ALBERTS et al., 2010; BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004; SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013).

No câncer colorretal o processo de carcinogênese inicia-se predominantemente a partir do tecido epitelial, e na grande maioria dos casos provém de pequenas elevações presentes na parede do cólon e/ou do reto, denominados pólipos, um termo genérico para o crescimento saliente a partir de uma membrana mucosa (Figura 4) (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009; SOCIETY, 2018).

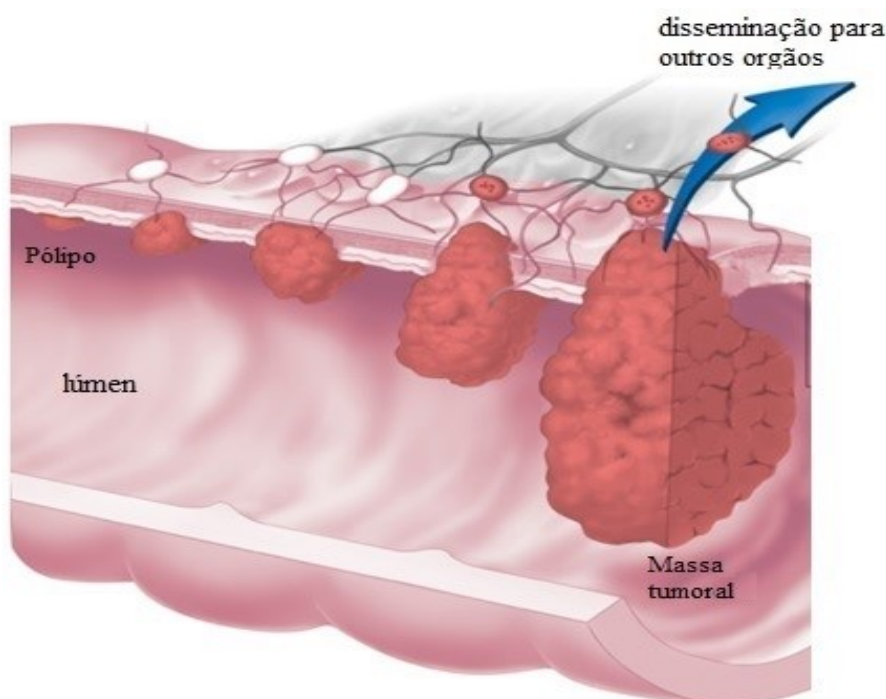


Figura 4. Estágios de desenvolvimento do câncer colorretal.
Fonte: Adaptado de SOCIETY, 2018.

Os pólipos geralmente são benignos e seu potencial de transformação maligna varia de acordo com seu tamanho, estrutura e grau de displasia epitelial (desenvolvimento anormal de células e tecidos). É preciso ressaltar que nem todo pólipos tem características neoplásicas, pois existem pólipos inflamatórios e linfóides que não apresentam atipia ou displasia celular, entretanto, pólipos epiteliais que apresentam proliferação anormal e elevado grau de displasia denominam-se adenomas e são consideradas lesões neoplásicas pré-malignas do cólon (DE

CASTRO COTTI, G. C. et al., 2000).

Durante o crescimento tumoral, a falta de nutrientes e de oxigênio no interior do tumor leva a formação de um núcleo necrótico hipoxiado e para suprir as demandas de nutrientes e oxigênio, necessárias para progressão da doença, o tumor recruta a formação de novos vasos (neovascularização) através de um processo chamado angiogênese (FERRARA, 2004; MORBIDELLI; DONNINI; ZICHE, 2003; NEUFELD et al., 1999; TIAN; BAE, 2012; WEHLAND et al., 2013; WEIS; CHERESH, 2011).

2.3 Angiogênese tumoral

A angiogênese, que ocorre naturalmente em vários processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, crescimento normal e diferenciação celular, cicatrização e no ciclo reprodutivo feminino, consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir da vascularização pré-existente (WEHLAND et al., 2013) e, basicamente, compreende as etapas de ativação das células endoteliais, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e neovascularização. Na angiogênese tumoral (Figura 5), todo esse processo pode ser desencadeado por diferentes vias de sinalização intracelular, sendo o óxido nítrico e o VEGF (fator pró-angiogênico), os principais agentes bioquímicos envolvidos (MORBIDELLI; DONNINI; ZICHE, 2003).

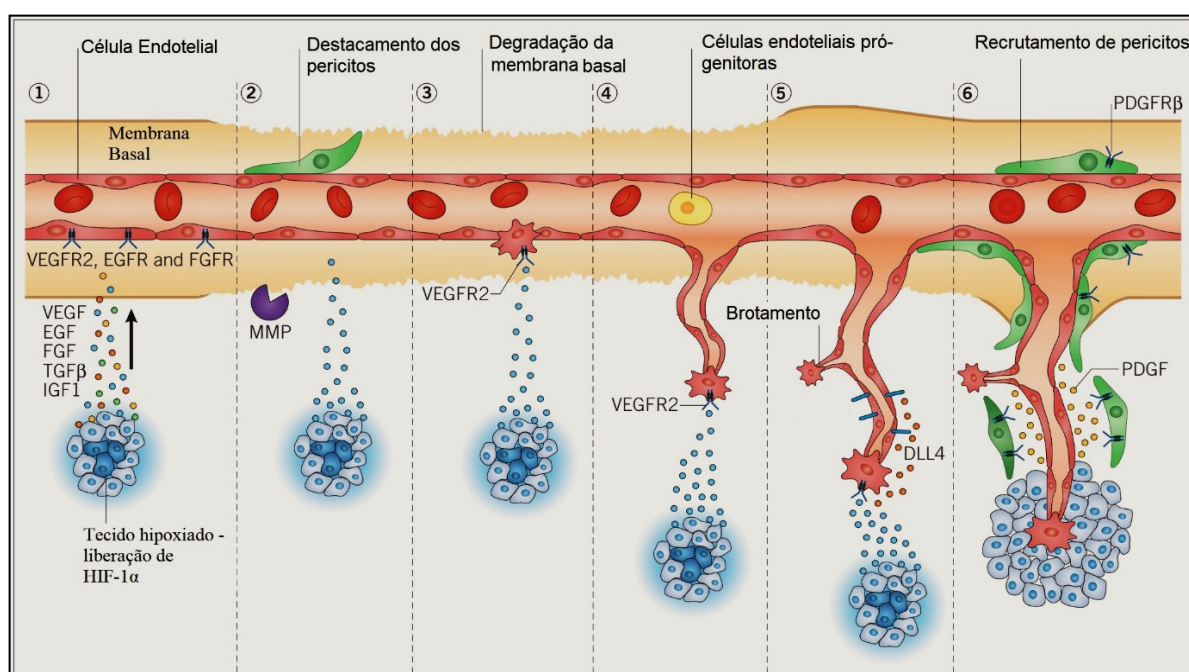


Figura 5. Etapas envolvidas na angiogênese

Fonte: Adaptado de *Angiogenesis*. Disponível em <https://www.tocris.com/literature/product-guides/cancer>. Acessado em 07/03/2019.

A expressão de VEGF é estimulada por alguns fatores de crescimento epitelial (Figura 5) como PDGF (do inglês, *Platelet-derived Growth Factor*), FGF (do inglês, *Fibroblastic Growth Factor*), EGF (do inglês, *Endothelial Growth Factor*), fator de necrose tumoral (TNF) (do inglês, *Tumoral Necrose Factor*), interleucina-1(IL-1) e hipóxia (DE FÁTIMA; DE CARVALHO, 2018). As formas solúveis de VEGF, VEGF-A, são as principais estimuladoras do crescimento de vasos sanguíneos em condições normais e patológicas (PETERS et al., 2007).

A família de VEGF, uma glicoproteína dimérica, que possui uma massa molar de aproximadamente 50 kDa, compreende cinco classes de glicoproteínas nomeadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (do inglês, *placenta growth fator*), os quais podem se ligar a três receptores, VEGFR-1 (ou Flt-1, receptor tirosina-quinase), VEGFR-2 (ou KDR) e VEGFR-3 (ou Flt-4) (HANRAHAN et al., 2003; RANIERI et al., 2006).

O VEGFR-1 está relacionado a migração celular e pode ser um regulador da angiogênese em processos fisiológicos normais, porém tem papel importante na angiogênese em condições patológicas. A presença do VEGFR-1 na superfície de células do câncer colorretal, bem como sua ativação, são induzidas por alterações fenotípicas relacionadas a progressão e metástase tumoral. Por outro lado, o receptor VEGFR-2 atua na indução da permeabilidade vascular e proliferação de células endoteliais, enquanto o VEGFR-3 é responsável por regular o desenvolvimento e a manutenção do sistema linfático (KLEIN; LOEWENSTEIN, 2010).

A multiplicação desordenada e descontrolada das células tumorais leva a formação de núcleos necróticos, presentes na massa tumoral, devido a falta de oxigênio. O tecido hipoxiado libera uma proteína chamada fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF-1 α - *hypoxia inducible factor-1 α*) que é responsável pelo estímulo da transcrição de fatores pró-angiogênicos, sendo o principal deles o VEGF (VEGF-A). Uma vez aumentada a produção de VEGF-A, este se liga aos receptores de tirosina quinase (VEGFR), regularmente expressos na superfície de células endoteliais porém superexpressos em tecidos tumorais hipoxiados, promovendo a produção de óxido nítrico e de enzimas proteolíticas, denominadas metaloproteases de matriz (MMPs) (ALBERTS et al., 2010a; FÁTIMA; PAPA, 2010; FERRARA et al., 2004), os quais são responsáveis pela degradação da membrana basal dos vasos pré-existentes (Figura 5).

Uma vez degradada a membrana basal, os pericitos (célula do tipo mesenquimal, associadas à parede dos vasos) se destacam do vaso permitindo o extravasamento de proteínas, citocinas e elementos celulares para a matriz extracelular que, conseqüentemente, atrai células

endoteliais que sobre a ação do VEGF se diferenciam e se proliferam levando a formação do novo vaso. Em seguida, através do processo de maturação e estabilização dos vasos recém-formados o próprio VEGF estimula, naturalmente, a produção de citocinas que bloqueiam os receptores de VEGFR (NEUFELD et al., 1999; WANG et al., 2005; WEHLAND et al., 2013; WEIS; CHERESH, 2011). Ao final de todo o processo, os pericitos são novamente recrutados, pela ativação do fator PDGF, se ligam a parede externa do vaso proporcionando a sustentação dos vasos, tornando a rede vascular mais estável (NEUFELD et al., 1999; WANG et al., 2004; WEHLAND et al., 2013; WEIS; CHERESH, 2011).

A ativação da angiogênese também desencadeia a produção de óxido nítrico, responsável pela dilatação dos vasos e diminuição da resistência vascular, tornando a estrutura anatômica dos vasos neoformados diferentes daqueles presentes nos tecidos normais, com ramificações aberrantes, espaços intercelulares maiores e com poros na superfície dos vasos, o que garante o suprimento nutricional e de oxigênio ao tumor (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; IYER et al., 2006). Esse processo também é responsável pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentados (EPR, do inglês *enhanced permeability and retention*), presente exclusivamente em tumores sólidos, responsável pela hipervascularização do tecido tumoral (ASLAN et al., 2013; MATTOS, 2013; SINHA et al., 2006).

Todo esse processo angiogênico têm sido alvo de intensa pesquisa, uma vez que está diretamente relacionado com a agressividade tumoral e maior ocorrência de metástases (PEREIRA et al., 2008). Nesse sentido, o bloqueio da angiogênese deve contribuir para a regressão dos vasos tumorais e, conseqüentemente, à regressão do tumor.

Com o avanço da biotecnologia farmacêutica a produção de medicamentos biológicos, que incluem desde estruturas mais simples (peptídeos) até as mais complexas (anticorpos monoclonais) e de elevada especificidade, abre caminhos para produção de novos produtos biotecnológicos, criando possibilidades inéditas de desenvolvimento para a indústria farmacêutica (ELBAKRI; NELSON; ODEH, 2010). Essas moléculas são capazes de inibir a angiogênese por diferentes mecanismos, como o bloqueio na síntese de proteínas angiogênicas, produzidas pelas células tumorais; a neutralização dos receptores de angiogênese expressos no endotélio; e a indução direta da apoptose de células endoteliais (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004; RIANNA; KUMAR; RADMACHER, 2018).

Os mAbs anti-VEGF representam uma importante abordagem para o tratamento de uma ampla variedade de tumores sólidos. O uso dessas biomoléculas, isoladamente ou em combinação com a quimioterapia e/ou radioterapia, tem contribuído significativamente para

aumento da sobrevida global do paciente e da sobrevida livre da progressão da doença (período de tempo após o tratamento do câncer, durante o qual o paciente sobrevive sem nenhum sinal da doença) (GARCIA et al., 2008; GIANTONIO et al., 2007; GROTHEY et al., 2008; GUSTAVSSON et al., 2015; HURWITZ et al., 2004; MA; WAXMAN, 2008; MI et al., 2015; SALTZ et al., 2008).

Diversos fármacos destinados a terapia anti-angiogênica, por atuarem contra os fatores pró-angiogênicos e/ou contra seus receptores de superfície endotelial já foram aprovados pelo FDA, dentre eles, pequenas moléculas inibidoras dos receptores de fatores pró-angiogênicos como o Sitvarga (Regorafenibe) da Bayer[®] e Sutent (Sunitinibe) da Pfizer[®]; os inibidores da mTOR, uma proteína alvo da rapamicina em mamíferos, representados pelos fármacos Afinitor (Everolimus) da Novartis[®] e Endostar (Endostatin) da Simcere[®]; e mais recentemente, os mAbs como Cyramza (Ramucirumabe) da empresa Eli Lilly[®] e o Avastin (Bevacizumabe) da Genentech[®] (BHISE et al., 2011).

Os mAbs representam um grupo heterogêneo de imunoproteínas extremamente importantes na pesquisa científica, no diagnóstico clínico, na imunoterapia e, mais recentemente, no tratamento de diversos tipos de câncer (CHEN et al., 2016; DE MUYNCK; NAVARRE; BOUTRY, 2010). Sua habilidade em reconhecer antígenos tumorais, com elevada especificidade, desencadeando respostas imunológicas com menos efeitos colaterais comparado aos quimioterápicos convencionais, tem resultado em grandes avanços no campo da oncologia (TONON; SECOLI; CAPONERO, 2007). Nesse sentido, o uso de mAbs representam um avanço no tratamento bem sucedido de diferentes tipos de cânceres, de forma mais específica e eficaz.

2.4 Bevacizumabe

O BVZ, disponível comercialmente na forma de solução transparente para infusão endovenosa (Avastin[®]) foi o primeiro mAb usado na terapia anti-VEGF aprovada pelo FDA, em 2004 (FERRARA et al., 2004; SASICH; SUKKARI, 2012), sendo utilizado em combinação com o 5-fluorouracil para tratamento do câncer colorretal, câncer de mama, câncer de pulmão e câncer de ovário. Em 2009, o FDA liberou o uso do BVZ também no tratamento do glioblastoma multiforme (KAZAZI-HYSENI; BEIJNEN; SCHELLENS, 2010)

No Brasil, o BVZ foi registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2005 para o tratamento do câncer colorretal e, desde então, sua administração

isolada ou em combinação com outros agentes antineoplásicos, como irinotecan, 5-fluorouracil e leucovorin, tem conduzido a importantes avanços na terapia antitumoral, mostrando consideráveis benefícios, em relação sobrevida global e sobrevida livre de progressão da doença, que se sobrepõe à toxicidade (FERRARA et al., 2004; FERRARA et al., 2005; GALFRASCOLI et al., 2011; PAVLIDIS; PAVLIDIS, 2013).

O BVZ é um mAb recombinante humanizado do tipo IgG produzido pela tecnologia do DNA recombinante, a partir de um sistema de expressão em célula de ovário de Hamster Chinês. Derivado do mAb murino VEGF, o BVZ é constituído por aproximadamente 93% da sequência proteica humana e 7% da proteína murina. Possui uma massa molar de aproximadamente 149 kDa e estruturalmente apresenta uma forma semelhante a letra “Y”, com duas cadeias polipeptídicas leves, contendo 214 resíduos de aminoácidos (25 kDa), e duas cadeias pesadas com 453 resíduos (50 kDa). As cadeias pesadas são unidas por duas ligações dissulfeto e uma região flexível denominada *hinge region* (região de dobra) (Figura 6) (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; JANEWAY JR et al., 2001; ZHANG; PAN; CHEN, 2009).

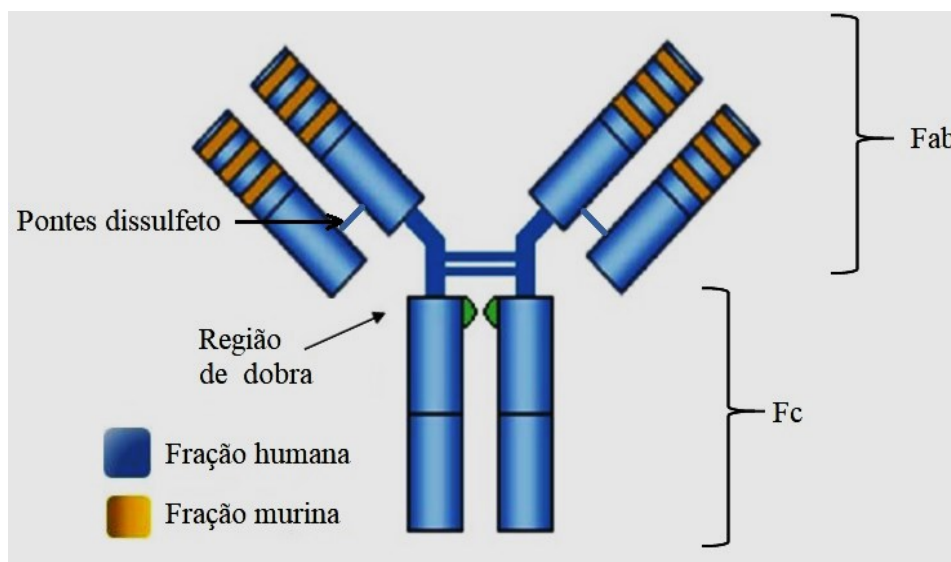


Figura 6. Estrutura do Bevacizumabe.

Fonte: Adaptado de: KIM; PARK; HONG, 2005.

O mecanismo de ação do BVZ consiste na neutralização específica do VEGF, impedindo sua ligação com seus receptores tirosina-quinase Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2), os quais são predominantemente encontrados na superfície das células endoteliais (Figura 7). Ao inativar a ação do VEGF, a cascata de sinalização celular mediada por esse fator é atenuada/bloqueada levando a redução do crescimento microvascular e, conseqüentemente, a interrupção do fornecimento de sangue aos tecidos tumorais. Adicionalmente, além dos efeitos

sobre a vasculatura, o BVZ pode reduzir a pressão intersticial, aumentar a permeabilidade vascular e favorecer a apoptose das células endoteliais tumorais (CHEN et al., 2016; KAZAZI-HYSENI et al., 2010; KOTOWSKI et al., 2018).

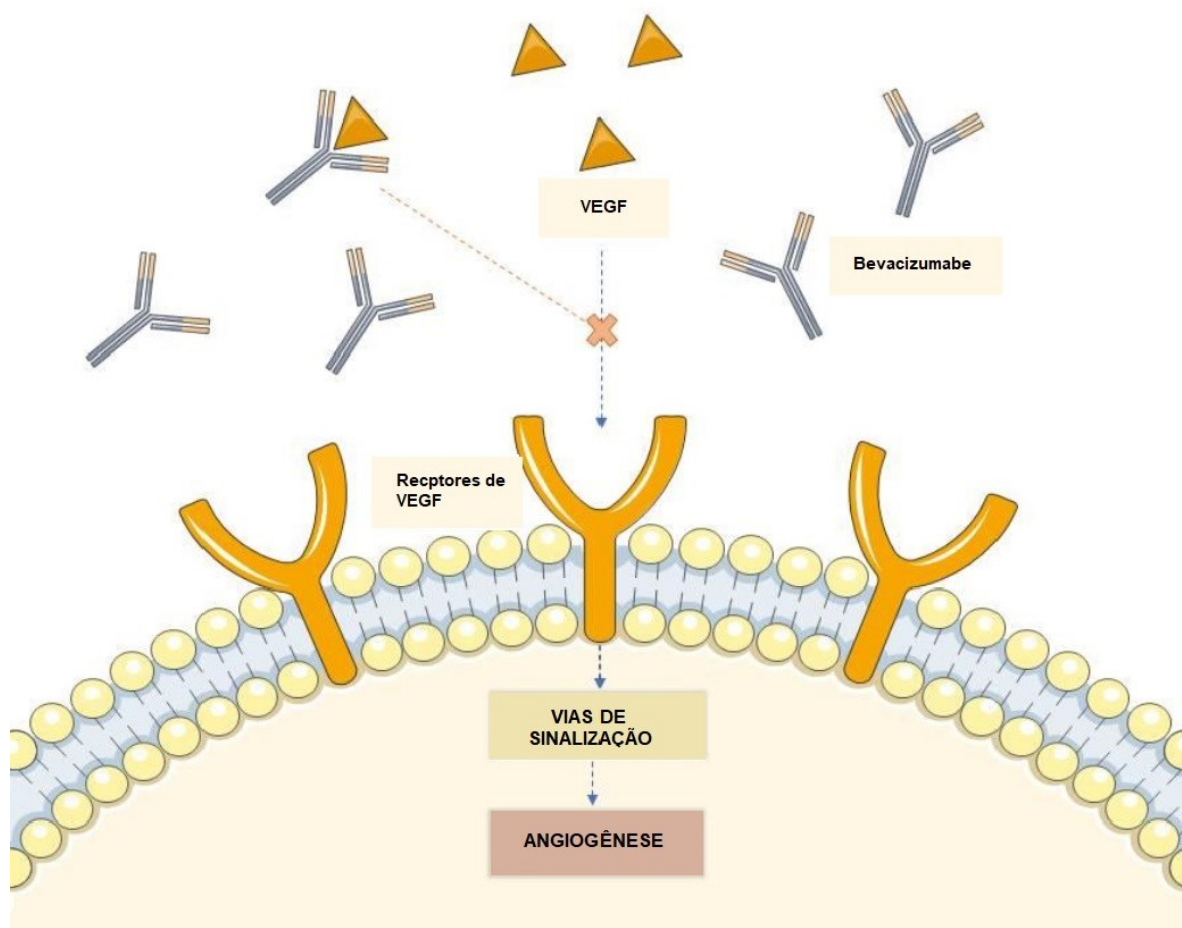


Figura 7. Inibição VEGF pelo BVZ.
Fonte: Adaptado de: KOTOWSKI et al., 2018.

Após exercer seu mecanismo de ação, o metabolismo e a eliminação de BVZ é semelhante ao da IgG endógena, através do catabolismo proteolítico que ocorre em todo o corpo, inclusive nas células endoteliais, e não depende fundamentalmente da eliminação renal ou hepática (WANG et al., 2011). Assim, o BVZ é absorvido por pinocitose endossomal e, em seguida, se liga ao receptor Fc neonatal (FcRn), que possui alta afinidade por proteínas do tipo IgG. Esta ligação retarda a degradação do anticorpo, protegendo-o da eliminação sistêmica o que, conseqüentemente, resulta em uma meia-vida relativamente longa (YAN; HSU; BECKMAN, 2008; KAZAZI-HYSENI; BEIJNEN; SCHELLENS, 2010).

De acordo com Lu e colaboradores (2008), após a administração endovenosa de BVZ

(1 a 20 mg/kg) em 491 pacientes, durante uma, duas ou três semanas, foi verificado uma meia vida de aproximadamente 20 dias.

Efeitos adversos associados a ação sistêmica do BVZ quando administrado pela via endovenosa, como hipertensão, eventos tromboembólicos, proteinúria, insuficiência cardíaca congestiva, hemorragia, perfuração gastrointestinal foram observados nos pacientes em tratamento (SHIH; LINDLEY, 2006; TURNER et al., 2014). A dose máxima de BVZ tolerada é de 20 mg/Kg e dependendo da gravidade dos efeitos colaterais, a administração de BVZ deve ser descontinuada temporária ou permanentemente (KAZAZI-HYSENI; BEIJNEN; SCHELLENS, 2010).

O BVZ é responsável por inibir mais de 97% do VEGF sérico, o qual é predominantemente derivado de plaquetas, porém esse bloqueio resulta no desenvolvimento de sérios efeitos colaterais, como hipertensão, cicatrização prejudicada de feridas, sangramento e perfurações gastrointestinais (VERHEUL et al., 2007; KAZAZI-HYSENI; BEIJNEN; SCHELLENS, 2010). O efeito adverso mais frequentemente observado é a hipertensão arterial (TURNER et al., 2014; CHELLAPPAN et al., 2018; RANIERI et al., 2006).

A terapia anti-VEGF isolada ou combinada com outros agentes quimioterápicos e/ou com a radioterapia representa uma abordagem promissora no tratamento de diversos tipos de tumores sólidos em estágio inicial de desenvolvimento e em processos de metástases (KIM et al., 2005; WARREN et al., 1995); entretanto, a existência dos diversos efeitos colaterais acima citados, associado à predisposição das células tumorais tornarem-se mais resistentes a esses agentes quimioterápicos (ESTANQUEIRO et al., 2015; JAIN et al., 2010; OLIVEIRA, 2014; ORIVE et al., 2005; SINHA et al., 2006; WANG et al., 2010) demonstram a urgente necessidade de se buscar novas alternativas para melhorar a terapia antitumoral anti-angiogênica.

Propriedades intrínsecas do BVZ como elevada massa molar, hidrofília e carga de superfície pH dependente, bem como a baixa permeabilidade são fatores limitantes quando o objetivo é a absorção e sua biodisponibilidade oral. Além disso, sua elevada instabilidade físico-química nos segmentos superiores do TGI, onde a condições ácidas, presença de sais biliares e suco pancreático são responsáveis por provocar alterações físicas (como auto-agregação e precipitação) e químicas (alterações nas ligações químicas como desamidação, oxidação, hidrólise) nas proteínas impõe grandes dificuldades para sua administração oral (COSTA; SILVA, 2017; LIECHTY; PEPPAS, 2012; SILVA et al., 2002).

Em busca de novas alternativas à terapia anti-angiogênica convencionalmente

administrada por via endovenosa, novos sistemas de liberação têm sido desenvolvidos para a veiculação do BVZ. Andrew e colaboradores (2010) demonstraram que filmes de sílica mesoporosa nanoestruturados permitiram a liberação sustentada do BVZ por um período de aproximadamente 30 dias. O controle das taxas de liberação do BVZ por 91 dias, em tampão fosfato salino (PBS) 10mM, também foi relatado por Li e colaboradores (2012), em estudos com nanopartículas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) para administração intravitreal para tratamento da degeneração macular. Em estudos mais recentes, Ferreira e colaboradores (2017) demonstraram que a veiculação do BVZ em hidrogéis de alginato permitiu a preservação da conformação estrutural dessa proteína, em meios como diferentes valores de pH (4,8 e 7,4), considerando biorrelevantes para o microambiente tumoral, demonstrando a potencialidade dos sistemas para a aplicação local em diferentes tipos de tumores sólidos.

Apesar do desenvolvimento de sistemas de liberação para administração oral de proteínas representar um grande desafio, considerando as diversas barreiras impostas pelos ambientes do TGI, o desenvolvimento de nanopartículas mucoadesivas baseadas na mistura dos polissacarídeos naturais, GG e AR, para a liberação cólon específica do BVZ constitui uma estratégia racional e inovadora que pode representar uma nova alternativa para o tratamento local do câncer colorretal, visando a otimização da eficácia terapêutica e redução dos efeitos colaterais.

2.5 Sistemas para liberação cólon-específica de fármacos

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos representa uma estratégia racional, uma vez que esses sistemas permitem o controle temporal e/ou espacial das taxas de liberação de fármacos (COIMBRA, 2010), contribuindo para a manutenção dos níveis plasmáticos, redução dos efeitos colaterais e da frequência de administração, ao contrário das formas farmacêuticas convencionais, que liberam o fármaco logo após sua desintegração e dissolução (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; BASIT, 2005; LYRA et al., 2007).

A escolha do cólon como sítio para liberação, ação e/ou absorção de fármacos baseia-se nas suas características particulares, como pH próximo da neutralidade e baixa atividade proteolítica, as quais tornam o ambiente colônico menos hostil para fármacos de origem proteica, como BVZ. Além disso, seu tempo de trânsito mais prolongado deve aumentar o

tempo de retenção do sistema de liberação nesse órgão (BASIT, 2005; WILSON, 2010; WILSON; BASIT, 2005).

Anatomicamente, o cólon possui uma extensão de aproximadamente 1,5 metros de comprimento e compreende desde a valva ileocecal até o ânus. É subdividido em ceco, apêndice, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e canal anal, como mostra a Figura 8 (FADDA; BASIT, 2005; FREIRE et al., 2006). A absorção de fármacos no cólon ocorre particularmente na região ascendente, devido à baixa viscosidade do conteúdo intestinal nesta porção. Em contrapartida, absorção de fármacos é mais restrita no cólon transverso e descendente, possivelmente devido a reduzida quantidade de água e a solidificação do conteúdo fecal (FREIRE et al., 2006).

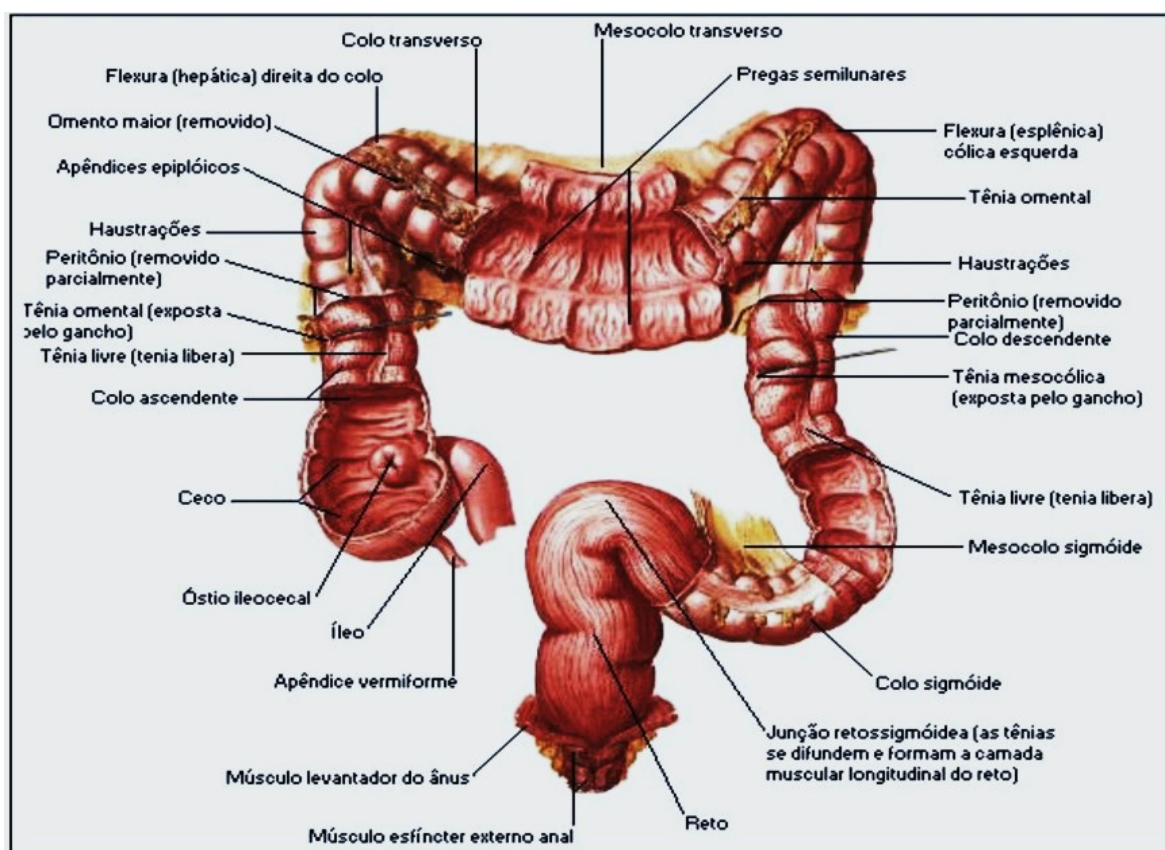


Figura 8. Anatomia do cólon.

FONTE: Adaptado de Sobotta, 2000.

A liberação cólon específica representa uma abordagem promissora para o tratamento de diversas doenças intestinais como a doença inflamatória intestinal (DII), síndrome do intestino irritável (SCI) e, particularmente, o câncer colorretal (BONI, 2017).

De acordo com as estratégias exploradas para o desenvolvimento dos sistemas de

liberação colônica, esses podem ser denominados como sistemas tempo-dependente, pH-dependente, microflora-dependente e pressão intraluminal-dependente (CHEN et al., 2016; FERRARI et al., 2013; FRIEND, 2005; PRASANTH; JAYAPRAKASH; MATHEW, 2012; RANGARI; PURANIK, 2015; SOWMAYA; REDDY; NEELABOINA, 2012).

Independentemente da estratégia explorada, para se alcançar a liberação colônica de fármacos, as barreiras impostas pelas condições variáveis nas porções superiores do TGI, em relação ao pH, tempo de trânsito e atividade proteolítica devem ser superadas.

Com o avanço da tecnologia farmacêutica no sentido de buscar novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer colorretal, diferentes sistemas têm sido desenvolvidos como as microesferas (ZHAO et al., 2013), pellets (ELYAGOBY; LAYAS; WONG, 2013), hidrogéis (SHANTHA; RAVICHANDRAN; RAO, 1995), micropartículas (CHAURASIA et al., 2008), nanopartículas (BONI et al., 2018) lipossomas (OGAWARA et al., 2009), nanopartículas lipídicas sólidas (YASSIN et al., 2010) nanosuspensões (DOS SANTOS et al., 2017).

A vetorização do BVZ em nanopartículas pode agregar importantes vantagens no tratamento do câncer colorretal, uma vez que os sistemas possuem um grande potencial para proteger o fármaco e superar as limitações impostas pelo TGI e, dessa forma, promover a liberação cólon específica do BVZ. É importante destacar que características como hidrofília, elevada massa molar e a baixa permeabilidade/biodisponibilidade de fármacos de origem proteica, como o BVZ, devem reduzir a absorção do fármaco, e tais características são atributos favoráveis ao objetivo pretendido, uma vez que deve favorecer o acúmulo do BVZ no local de ação.

2.5.1 Nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos

Um dos pioneiros no campo da nanotecnologia foi o professor Peter Paul Speiser, do Instituto Federal Suíço de Tecnologia, em Zurique, que no final da década de 1960 foi responsável pelo desenvolvimento das primeiras nanopartículas para liberação de fármacos e vacinas. O final do século XX e início do século XXI foram marcados pelo desenvolvimento de nanopartículas capazes de transportar de forma específica, fármacos, biomacromoléculas e vacinas objetivando a redução dos efeitos tóxicos e maximização da eficácia terapêutica (KREUTER, 2007). Desde então, vários estudos têm sido realizados para a aplicação de nanopartículas no transporte de fármacos antineoplásicos, fármacos antiretrovirais,

antibacterianos, entre outros (BONI et al., 2018; BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004; DING et al., 2016; DUDHANI; KOSARAJU, 2010; FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2015; HANS; LOWMAN, 2006)

A liberação sítio-específica de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados pode apresentar importantes vantagens biofarmacêuticas e farmacocinéticas em relação aos sistemas convencionais, uma vez que a nano-compartmentalização do fármaco permite a modulação das propriedades físico-químicas e de liberação, bem como de suas interações com a interface biológica sem causar alterações em suas propriedades estruturais (BONI, 2017; OLIVEIRA; SANTOS; et al., 2010; SOLARO; CHIELLINI; BATTISTI, 2010; SURI; FENNIRI; SINGH, 2007).

Nanopartículas são caracterizadas como sistemas coloidais com tamanhos inferiores a 1000 nm, sendo esse parâmetro de grande importância nas aplicações clínicas, uma vez que estão diretamente relacionadas com as interações físicas e químicas com as biomoléculas presentes no organismo (LIMA, 2018).

A utilização de nanopartículas para a vetorização de fármacos apresentam várias vantagens, como as reduzidas dimensões, os quais devem favorecer o acúmulo do fármaco no local de ação e/ou absorção, podem influenciar nos perfis de distribuição, destino biológico, toxicidade e na capacidade de direcionamento para alvos específicos. A composição, a carga de superfície, porosidade, cristalinidade e hidrofília podem ser moduladas para atender necessidades específicas agregando propriedades particulares aos sistemas, tornando-os capazes de responder a estímulos específicos. Adicionalmente, a capacidade de estabelecer interações físico-químicas com as biomoléculas irá influenciar no comportamento biológico dos sistemas nanoestruturados (BONI, 2017; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SINGH; LILLARD, 2009).

O comportamento biológico dos sistemas nanoestruturados depende das interações entre o nanosistema e as interfaces biológicas, que constituem a chamada nano-biointerface que representa uma importante área de pesquisa que visa o uso seguro da nanotecnologia e design de nanomateriais para aplicações biológicas (BONI, 2017; MOHAPATRA; NAGARAJ; MOHAPATRA, 2013; NEL et al., 2009)

O conhecimento dos fatores envolvidos na nano-biointerface é de fundamental importância para propor melhores estratégias terapêuticas e compreende três componentes principais que interagem de forma dinâmica: (a) a superfície de nanopartículas, em que as características são determinadas pela sua composição e estrutura; (b) a interface sólido-líquido

e as alterações que podem ocorrer quando a partícula interage com os componentes do organismo; e a (c) zona de contato da interface sólido-líquido com substratos biológicos (NEL et al., 2009).

Em estudos recentes, Sharma e colaboradores (2013) desenvolveram nanosistemas baseados em goma guar, contendo metotrexato, marcado com ácido fólico com intuito de direcionar o fármaco para o câncer colorretal. Os autores verificaram que os sistemas exibiram um perfil de liberação pH dependente, demonstrando potencial para liberação colônica, além de conferir a proteção do fármaco contra a degradação nos segmentos superiores do TGI. Adicionalmente, a citotoxicidade das nanopartículas marcadas com ácido fólico foi maior em relação àquelas não marcadas e ao fármaco livre, indicando a capacidade dos sistemas de se ligar aos receptores de folato, superexpressos nas células tumorais e escassos nos tecidos saudáveis.

Em recente trabalho de nosso grupo de pesquisa, nanopartículas de quitosana e ácido hialurônico, com ou sem hidroxipropilmetilcelulose foram projetadas para a liberação cólon-específica do metotrexato. Os nanosistemas foram obtidas com sucesso através da técnica de complexação polieletrólítica e os resultados evidenciaram a capacidade dos nanosistemas para liberação e/ou absorção de fármacos no cólon, demonstrando o potencial para o tratamento patologias colônicas locais ou sistêmicas (BONI et al., 2018).

As nanopartículas poliméricas ocupam uma posição de destaque entre os sistemas de liberação de fármacos atualmente disponíveis, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, em condições biológicas (BANERJEE et al., 2017), e de acordo com o processo de obtenção, composição e organização estrutural podem apresentar propriedades físico-químicas moduláveis de acordo com necessidades específicas (BONI et al., 2018).

Em relação ao processo de preparação adotado e a composição é possível obter dois tipos de nanopartículas: aquelas em que o fármaco pode estar molecular ou fisicamente disperso em uma matriz polimérica (nanoesferas); e aquelas em que o fármaco encontra-se encapsulado em um sistema reservatório (nanocápsulas) (Figura 9) (FONTE et al., 2018).

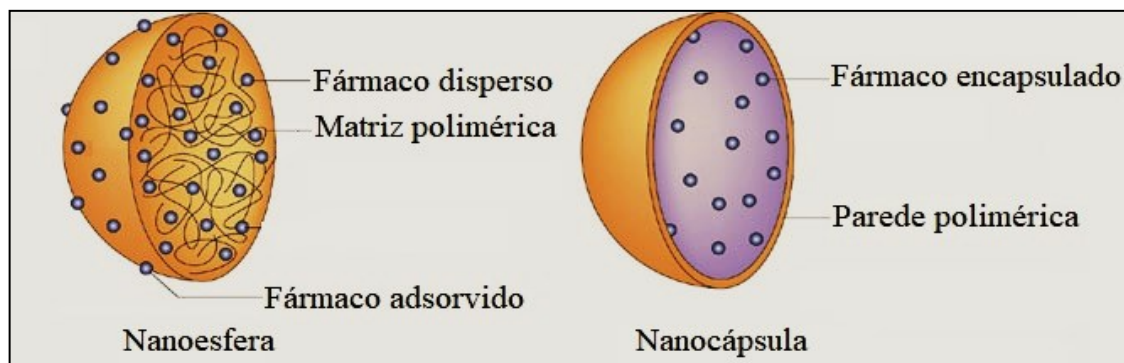


Figura 9. Representação esquemática das nanoesferas e nanocápsulas poliméricas.

FONTE: <<http://www.camelcitydispatch.com/can-winston-salem-based-alt-energy-nano-tech-be-used-to-combat-cancer/nrmicro2437-f2/>>. Acessado em 12/03/2019.

Diversas técnicas podem ser empregadas para a obtenção das nanopartículas, dentre elas, a emulsificação/microemulsificação seguida da extração do solvente por evaporação (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009), a emulsificação sob alta pressão (KÖHLER et al., 2010), polimerização interfacial (MAHESH D et al., 2010), o *nanospray-drying* (SADEGH POURSHAHAB et al., 2011), entre outros. No entanto, todas estas técnicas possuem algumas desvantagens como alto custo, o uso de solventes orgânicos, aplicação de elevadas temperaturas e/ou agitação, os quais podem causar a degradação do fármaco incorporado, principalmente os de origem proteica como o BVZ.

Como alternativa aos diferentes métodos citados, as técnicas de complexação polieletrólítica e reticulação iônica tem se destacado e podem contribuir para o desenvolvimento de novos nanocarreadores poliméricos com atividade mais específica e efetiva.

A obtenção de nanopartículas empregando o método de complexação polieletrólítica baseia-se na interação entre polímeros de carga oposta (Figura 10), podendo ocorrer por interações supramoleculares, como interações eletrostática, hidrofóbicas, dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, resultando na formação de partículas coloidais (BEZERRA, 2016; LUO; WANG, 2014; VAN DER GUCHT et al., 2011).

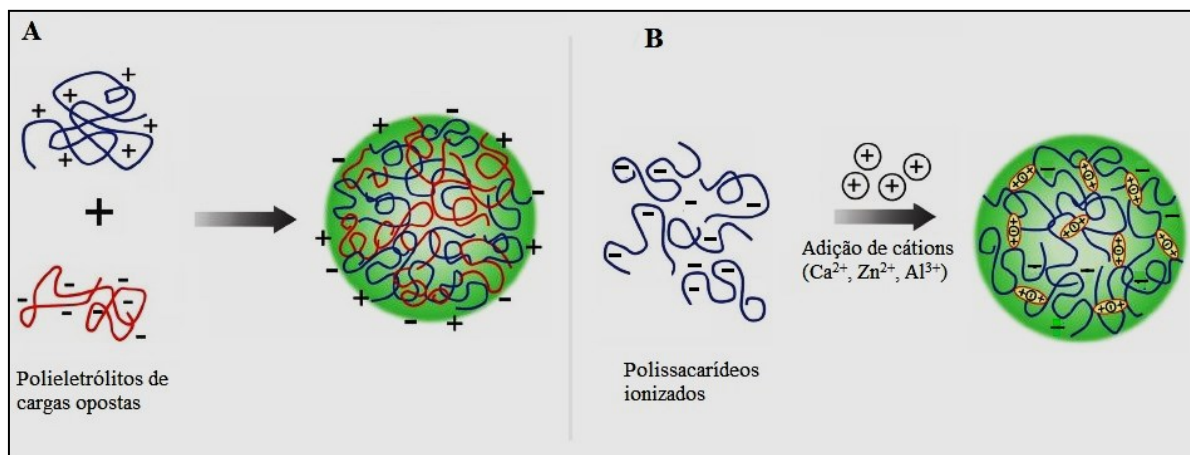


Figura 10. Nanopartículas obtidas por complexação polieletrólítica (A) e por reticulação iônica (B).
Fonte: Adaptado de MIZRAHY; PEER, 2011.

Na escolha por esse método de obtenção deve-se levar em conta algumas características relacionadas aos polímeros e aos solventes utilizados, como massa molar, densidade de cargas dos polieletrólitos, pH do meio, proporção da mistura e temperatura (BEZERRA, 2016; KIZILAY; KAYITMAZER; DUBIN, 2011; WOITISKI et al., 2009).

A formação de nanopartículas de quitosana e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), contendo insulina, por complexação polieletrólítica foi estudada por Makhlof e colaboradores (2011), e a capacidade mucoadesiva e mucopenetrante dos sistemas, bem como seu potencial para liberação oral da insulina foi demonstrado.

Em estudos mais recentes, Tan e colaboradores (2016) desenvolveram nanopartículas utilizando quitosana (catiônica) e goma arábica (aniônica) para encapsulação do antioxidante curcumina. Os resultados mostraram que as nanopartículas foram capazes de promover a liberação retardada de curcumina ao longo do TGI. Da mesma forma, nanopartículas poliméricas foram desenvolvidas por Pedreiro e colaboradores (2016), através da complexação polieletrólítica de diferentes proporções entre a zidovudina (aniônica) e os polímeros quitosana (QS) (catiônica) e ftalato de HPMC (aniônico), e os resultados demonstraram que o aumento da biodisponibilidade do fármaco foi alcançado.

A reticulação iônica baseia-se na interação entre polieletrólitos carregados positiva ou negativamente (macromoléculas aniônicas ou catiônicas) e íons de cargas contrárias (Figura 10). Assim, diferentemente da complexação polieletrólítica, a adição dos agentes reticulantes (por exemplo Ca^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+}), normalmente moléculas de baixa massa molar, levam a interações com os grupos funcionais (-OH, -COOH e NH_2) ionizados dos polímeros estabelecendo interações entre as cadeias poliméricas (BEZERRA, 2016; RAMPINO et al., 2013; VIMAL et al., 2012).

Recentemente em nosso grupo de pesquisa, Meneguín e colaboradores (2018) demonstraram que micropartículas de GG obtidas pela reticulação com íons Al^{3+} e revestidas com filmes de amido resistente/pectina permitiram a modulação de propriedades físico-químicas e de liberação da insulina. Os dados *in vivo* demonstraram que a duração da atividade hipoglicemiante da insulina foi de até 7 horas, e a redução da glicemia de até 50% foram verificados em ratos diabéticos, demonstrando o potencial dos sistemas para administração dessa proteína. Da mesma maneira micropartículas de GG/AR, reticuladas com Al^{3+} , foram obtidas por Cardoso (2014) e o potencial das micropartículas no controle de liberação do fármaco foi evidenciado pelas reduzidas taxas de liberação em meio ácido e manutenção do controle em pH 7,4.

Com base nos fatos expostos, a complexação polieletrólítica e a reticulação iônica representam estratégias tecnológicas vantajosas para obtenção de nanopartículas poliméricas, uma vez que os processos ocorrem em condições reacionais amenas, evitando uso de solventes orgânicos e elevadas temperaturas, além de serem técnicas financeiramente acessíveis (BERGER; REIST; MAYER; FELT; GURNY, 2004; MAKHLOF; TOZUKA; TAKEUCHI, 2011), o que deve permitir a incorporação e proteção de fármacos de origem proteica como BVZ.

2.5.2 Nanopartículas poliméricas mucoadesivas

A camada viscoelástica de muco que reveste a maioria das superfícies epiteliais do corpo (trato respiratório, gastrointestinal, reprodutivo e superfície ocular) possuem papel fundamental na função de proteção contra agentes patogênicos ou outros agentes nocivos, ao mesmo tempo que representa uma potencial barreira para liberação de fármacos na superfície mucosal (BANSIL; TURNER, 2006).

Para o desenvolvimento de um sistema com características mucoadesivas é importante conhecer as propriedades do muco ao longo do TGI e compreender as forças responsáveis pelas interações com a biointerface.

A mucoadesão ocorre através da adesão do sistema ao muco intimamente aderido à superfície da mucosa e esse processo envolve 3 etapas principais (Figura 11), sendo a primeira relacionada ao contato íntimo entre o sistema polimérico mucoadesivo e o muco. Em seguida, esse contato com o muco (composto por 95% de água) promove o intumescimento e o relaxamento das cadeias poliméricas, favorecendo a interação com a mucina (principal proteína do muco) através da interpenetração de cadeias. Finalmente, uma vez estabelecido o contato

íntimo entre o nanossistema e as membranas biológicas, interações supramoleculares (ligações de hidrogênio, iônicas, covalentes, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas) entre os nanossistemas e a interface biológica (nano-biointerface) (AHUJA; KHAR; ALI, 1997; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010; FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2007; HAGESAETHER; HIORTH; SANDE, 2009; SMART, 2005).

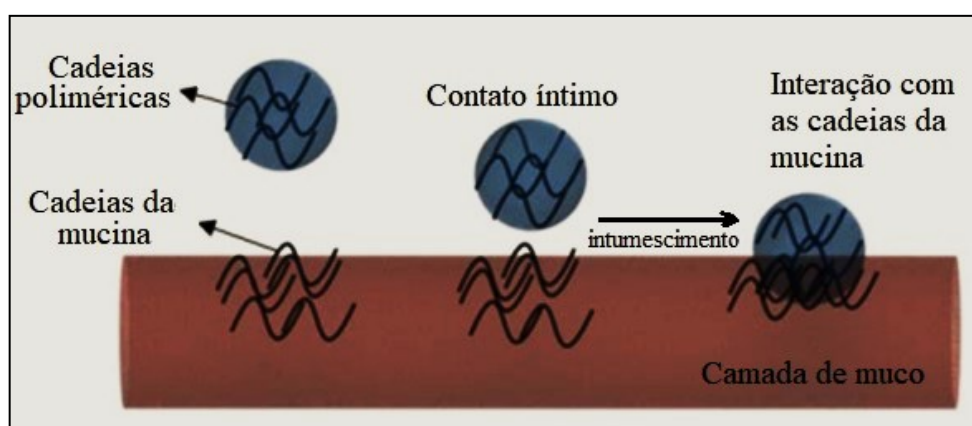


Figura 11: Representação esquemática das etapas de mucoadesão.
Fonte: Adaptado de: JAFARI et al., 2017.

Os mecanismos envolvidos no processo de mucoadesão são complexos e não são totalmente esclarecidos. Algumas das teorias descritas na literatura podem ajudar na compreensão do processo, dentre elas a teoria eletrônica (interação eletrostática entre as cargas elétricas opostas do sistema e a mucina presente no muco), da adsorção (interação por ligações de hidrogênio e van der Waals), da molhabilidade (aplicada a sistemas líquidos capazes de se dispersar sobre a mucosa), da difusão (intumescimento dos polímeros hidrofílicos e adesão a superfície da mucosa através da interpenetração das cadeias), da fratura (relacionada a força de adesão entre duas superfícies) e a mecânica (interação através do preenchimento de irregularidades presentes na superfície do sistema) (AHUJA et al., 1997; ANDREWS et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; HAGESAETHER et al., 2009).

A habilidade e intensidade das propriedades bio/mucoadesivas das nanopartículas são fortemente influenciadas pelas características dos polímeros que compõe o sistema (massa molar, hidrofílica, cargas de superfície, porosidade, cristalinidade, concentração, flexibilidade, conformação espacial das cadeias poliméricas e grau de intumescimento), pelo ambiente (pH, força aplicada) e pelas variáveis fisiológicas (espessura e tempo de renovação do muco, tempo de contato do sistemas com o muco e condições patológicas) (AHUJA et al., 1997; ANDREWS et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; HAGESAETHER et al., 2009). Assim, baseado na composição e nas estratégias para modificações físico-químicas dos materiais que compõem os

sistemas, todas essas propriedades citadas podem ser moduladas para atender às necessidades específicas, incluindo a possibilidade de modificações nos padrões de interação com a interface biológica (BONI et al., 2018; BONI et al., 2016; CARBINATTO et al., 2012; CARBINATTO et al., 2014; CARBINATTO et al., 2016; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN et al., 2014; OLIVEIRA; FERRARI; et al., 2010; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; SILVA; et al., 2018; PREZOTTI et al., 2014; RECIFE et al., 2017; SOARES et al., 2013).

A mucina, principal componente do muco, está diretamente relacionada à malignidade de diferentes tipos de tumores, uma vez que no microambiente tumoral verifica-se a hiperprodução dessas moléculas como forma de proteção (JOHANSSON et al., 2013). Nesse sentido, o aumento na produção e secreção de mucina no câncer colorretal deve ser considerada e pode ser explorada como estratégia no desenvolvimento de sistemas de liberação, aumentando a eficácia terapêutica.

A capacidade dos sistemas poliméricos mucoadesivos em prolongar o tempo de residência intestinal e favorecer a interação com membrana biológica deve contribuir para o acúmulo do fármaco no sítio de ação e/ou absorção (HÄGERSTRÖM, 2003; HAGESAETHER; HIORTH; SANDE, 2009; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; BONI *et al.*, 2018), favorecendo a terapia local antitumoral.

2.6 Polímeros

2.6.1 Goma gelana

A goma gelana (GG) é um exopolissacarídeo linear aniônico (DUAN et al., 2015; JANA et al., 2013; SARKAR et al., 2017; WANG; WEN; BAI, 2016) que, estruturalmente, apresenta quatro unidades repetidas, incluindo uma α -L-ramnose, duas β -D-glicose e um β -D-ácido glucurônico (MA; LIU, 2010; MA; COOMBES, 2014; MORRIS; NISHINARI; RINAUDO, 2012; SALUNKE; PATIL, 2016; SONJE; MAHAJAN, 2016; WANG et al., 2016). Possui uma massa molar de até 500 kDa (DUAN et al., 2015) e sua forma nativa é representada por dois tipos de substituintes, um acila com L-gliceril na posição 6 e um L-acetil localizado na posição 2 (Figura 12), ambos removidos através do processo de hidrólise alcalina para gerar duas formas comercialmente disponíveis: a Gelrite™ (CHAKRABORTY et al., 2014; WARREN; IN HET PANHUIS, 2015) representada pela GG de alta acetilação e a

Kelcogel™ também conhecida como GG desacetilada (ou de baixa acetilação) (MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015; ROSAS-FLORES; RAMOS-RAMÍREZ; SALAZAR-MONTOYA, 2013).

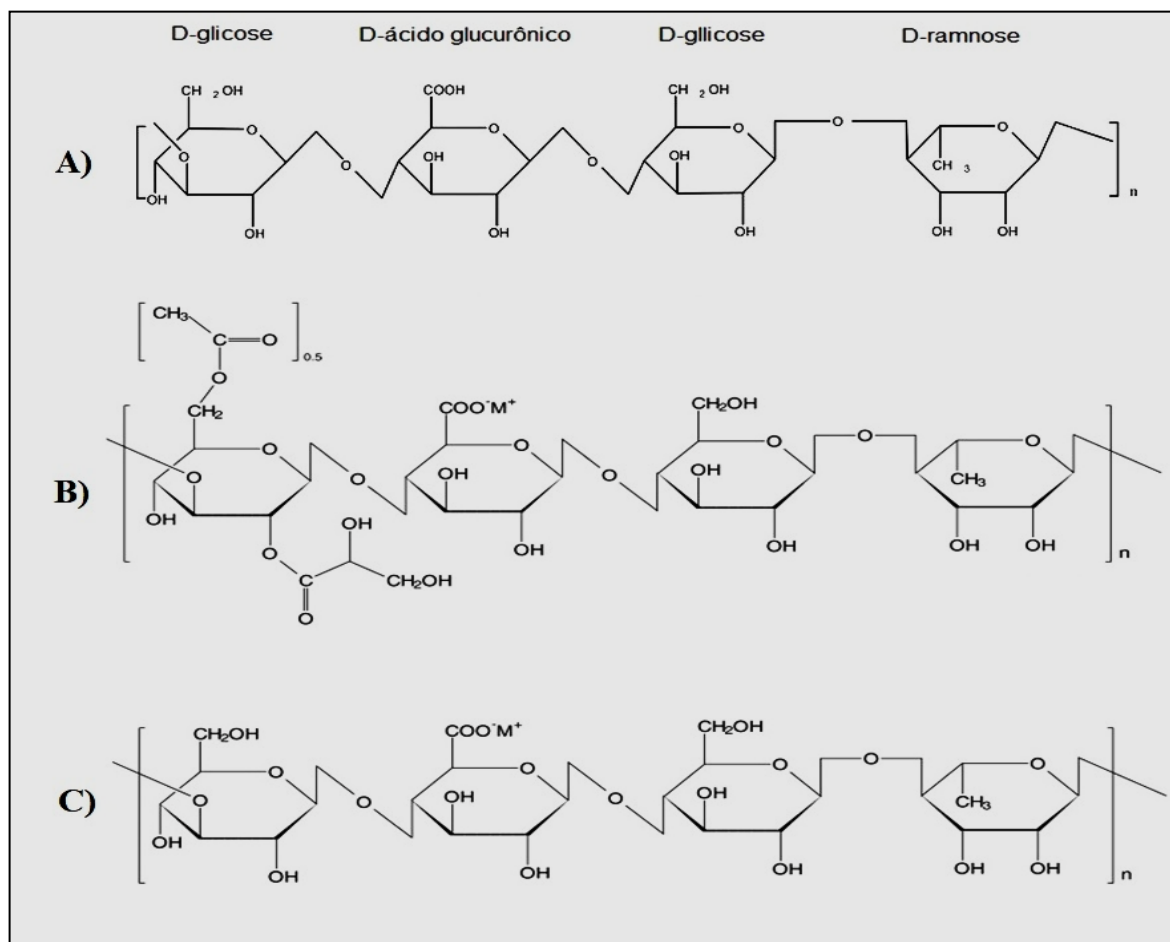


Figura 12. Estrutura química da GG nativa (A), acetilada (B) e desacetilada (C).

Fonte: Adaptado de: ZIA et al., 2018.

Com respeito às suas propriedades físico-químicas, a GG é estável sob condições ácidas e elevadas temperaturas (MORI; BARTH, 2013), sendo um polímero termo responsivo, biocompatível, biodegradável (KANG et al., 2015; WANG et al., 2016) e atóxico (SALUNKE; PATIL, 2016; SONJE; MAHAJAN, 2016). Possui reconhecida propriedade mucoadesiva (BONI et al., 2016; LEE et al., 2000; MAHDI et al., 2015; NARKAR et al., 2010; PREZOTTI, 2017; PREZOTTI et al., 2014; SALAMAT-MILLER et al., 2005) e sua característica aniônica contribui para formação de complexos polieletrólíticos com polímeros de carga oposta, como por exemplo a quitosana (VILELA et al., 2015). Em relação as suas propriedades reológicas, a GG apresenta comportamento pseudoplástico, sob altas taxas de

cisalhamento (HASHMINYA et al., 2013). Em ambiente fisiológico, sua capacidade de formar hidrogéis sob condições ácidas do estômago (NAG; HAN; SINGH, 2011) garante a proteção de fármacos ou biomoléculas contra a degradação química e enzimática (KUMAR et al., 2016; LIU et al., 2013; ZIA et al., 2018).

A GG possui um pKa de 3,5 e sua capacidade de geleificação depende de vários fatores, como a presença e tipo de cátions, pH, temperatura e concentração de polímero. A dispersão aquosa de GG apresenta um pH natural em torno de 5,0 e as cadeias da GG se encontram em um estado desordenado, devido à repulsão dos ânions carboxilatos laterais das cadeias intra e intermolecular, o que impede a agregação das hélices e formação de gel. Essa conformação também é verificada sob condições básicas, baixas concentrações, ausência de cátions e aquecimento. Em contrapartida, a redução de pH, maior concentração do polímero, resfriamento e/ou presença de cátions leva ao aumento do número de zonas de junção, resultando na agregação das duplas hélices e formação de uma estrutura tridimensional de géis fortes e resistentes (KIRCHMAJER et al., 2014; OSMAŁEK; FROELICH; TASAREK, 2014; PATIL et al., 2006; PICONE; CUNHA, 2013; PRAJAPATI et al., 2013; PREZOTTI et al., 2014; RAJINIKANTH; MISHRA, 2007; ZIA et al., 2018).

Estudos recentes em nosso laboratório, mostraram que a utilização da GG associada ao AR pode contribuir para melhoria das propriedades mecânicas (dureza, adesividade e coesividade) e reológicas dos hidrogéis. A maior concentração dos polímeros, bem como a reticulação iônica e covalente, contribuíram para a formação de estruturas fortes e resistentes, com características predominantemente elásticas (CARDOSO *et al.*, 2017).

Além disso, estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que os sistemas baseados em GG permitiram alcançar elevados teores de incorporação de diferentes de fármacos, bem como o efetivo controle das taxas de liberação (BONI et al., 2016; CARDOSO, 2014b; MENEGUIN et al., 2018; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; DE SOUZA E SILVA; et al., 2018; PREZOTTI et al., 2014).

2.6.2 Amido Retrogradado

O amido nativo é um polímero semicristalino formado por grânulos compostos predominantemente por um núcleo amorfo (amilose) envolto por anéis concêntricos cristalinos (amilopectina) alternadas com regiões amorfas (WANG et al., 2015).

A amilose possui uma massa molar de aproximadamente 105 e 106 Da e apresenta um grau de polimerização de 6000. Estruturalmente, suas cadeias são organizadas essencialmente de forma linear, com baixo grau de ramificação, sendo constituídas por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -D-(1-4). Por outro lado, a amilopectina possui uma estrutura altamente ramificada, constituída por ligações glicosídicas α -D-(1,4) e α -D-(1,6), com massa molar variando entre 107 e 109 Da e grau de polimerização de aproximadamente 2 milhões (Figura 13) (FREIRE et al., 2009; HARALAMPU, 2000; RODRIGUES; EMEJE, 2012).

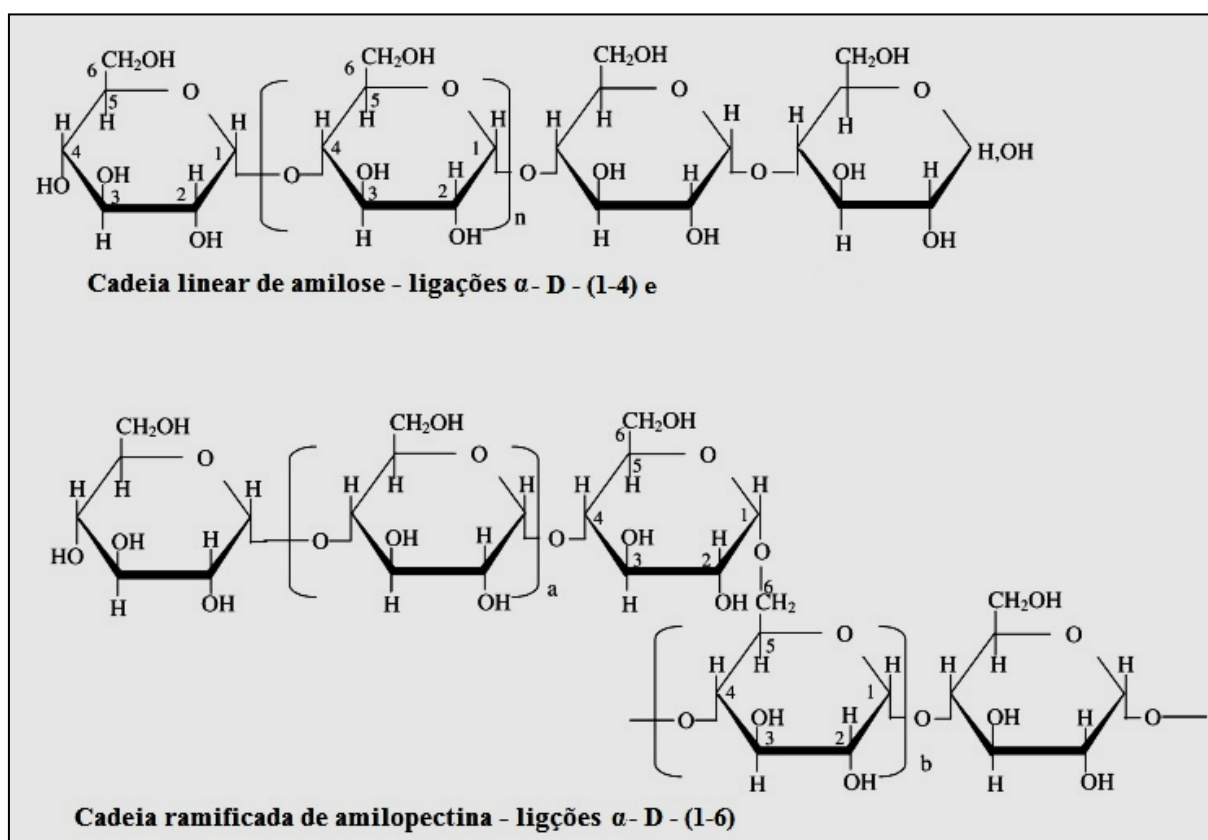


Figura 13. Estruturas da amilose e amilopectina.
Fonte: Adaptado de: TESTER; KARKALAS; QI, 2004.

Apesar de ser um material muito utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade (RASHID et al., 2011) e relativo baixo custo (RANA et al., 2011), o amido nativo frequentemente não apresenta propriedades físicas e químicas adequadas para determinadas finalidades. Nesse sentido as modificações físicas, químicas devem melhorar a estabilidade, adesão e textura, levando à formação de um material mais resistente à degradação enzimática, tornando o amido um potencial candidato para aplicação em sistemas específicos de liberação de cólon (CARBINATTO et al., 2012;

CARBINATTO et al., 2014; CHUNG et al., 2006; CURY et al., 2009b;2009c; HARALAMPU, 2000; HTOON et al., 2010; MENEGUIN et al., 2014; OLIVEIRA CARDOSO; STRINGHETTI ; et al., 2017; OLIVEIRA; FERRARI; et al., 2010; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014; PREZOTTI et al., 2012; RIOUX et al., 2002; THOMPSON, 2000; ZAVAREZE; DIAS, 2011).

A alta amilose (Hylon VII - ~ 68 % amilose - *National Starch & Chemical*) tem sido explorada como como matéria prima para produção de AR devido ao seu elevado conteúdo de amilose, o qual após o tratamento hidrotérmico permite a obtenção de um material retrogradado com elevado teor de amido resistente. Nesse sentido, considerando a capacidade do AR de escapar da digestão enzimática nas regiões superiores do TGI e sua degradação pela microbiota específica do cólon, o AR obtido a partir da alta amilose é considerado um material promissor para obtenção de sistemas para liberação cólon específica de fármacos (DIMANTOV et al., 2004; HTOON et al., 2009; SHAMAI; BIANCO-PELED; SHIMONI, 2003).

O AR (tipo 3) pode ser obtido por meio do tratamento hidrotérmico, que envolve ciclos de aquecimento/resfriamento das dispersões. De acordo com Tester and Morrison (1990), durante a gelatinização, a amilose é lixiviada dos grânulos de amido intumescidos, enquanto grande parte da amilopectina permanece no interior dos grânulos. A quebra das ligações de hidrogênio das cadeias de amilose e amilopectina e a ruptura de estruturas amorfas e cristalinas permite interação e absorção de água, que atua como plastificante. Nestas condições, a dispersão formada é caracterizada por uma rede mais flexível, predominantemente amorfa, com maior mobilidade de cadeias de polímeros (BEMILLER, 2011; DONA et al., 2010; HARALAMPU, 2000; LIU et al., 2007; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2011).

Quando o amido gelatinizado é, subsequentemente, armazenado em condições de resfriamento (4 °C), as cadeias de amilose e amilopectina podem sofrer um rearranjo gradual originando uma estrutura cristalina empacotada e mais resistente (WANG et al., 2015). Esta reassociação inter e intra-molecular é estabilizada por interações supramoleculares, tornando-se uma estrutura termodinamicamente mais estável (CHUNG et al., 2006; DONA et al., 2010; HARALAMPU, 2000; LIU et al., 2007). Esse processo promove a expulsão da água, em um processo denominado sinérese, resultando no aumento da viscosidade e na formação de um gel mais elástico e resistente contra a deformação (BEMILLER, 2011; DONA et al., 2010; WANG et al., 2015).

O AR tem sido extensivamente estudado em nossos laboratórios. Diferentes tipos de sistemas contendo AR foram desenvolvidos e caracterizados, e seu potencial como excipiente

para sistemas de liberação de fármacos foi evidenciado. Meneguim e colaboradores (2014) demonstraram que filmes obtidos com a mistura de AR/Pectina apresentaram propriedades mecânicas (resistência à perfuração e alongamento durante a perfuração), de absorção de líquidos e de barreira (permeabilidade ao vapor d'água) adequadas para aplicação como revestimento para sistemas de liberação. Posteriormente, esses filmes foram utilizados como material de revestimento para micropartículas de GG contendo insulina. O potencial dos sistemas para liberação oral da insulina foi demonstrado (MENEGUIM *et al.*, 2018).

Em outros estudos, Cardoso e colaboradores (2017) e Recife e colaboradores (2017) demonstraram que a retrogradação do amido em ciclos alternados de temperatura (4 °C/30°C, 2 dias em cada temperatura) restringiu a digestibilidade pela enzima pancreática α -amilase, de modo que o teor de amido resistente foi superior a 50%.

Neste estudo, o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (GG/AR) foi explorada como potencial estratégia para administração oral do BVZ para o tratamento local do câncer colorretal. A escolha dos polissacarídeos GG e AR baseou-se na potencialidade destas matérias-primas para a obtenção de sistemas para liberação cólon específica de fármacos, devido a suas propriedades mucoadesivas, de intumescimento e de liberação moduláveis, atoxicidade e biodegradabilidade específica desses polímeros por bactérias da microbiota colônica. As técnicas de complexação polieletrólítica, associada a reticulação iônica, exploradas para a obtenção das nanopartículas foram racionalmente selecionadas por permitirem o uso das condições reacionais amenas e evitarem o uso de solventes orgânicos.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o delineamento de nanopartículas mucoadesivas baseadas em goma gelana e amido retrogradado para administração oral e liberação cólon específica do bevacizumabe.

Etapas para alcançar o objetivo proposto

- Análise de propriedades físico-químicas da GG e do AR a fim de otimizar as condições para obtenção das nanopartículas;
- Preparação e caracterização das nanopartículas;
- Avaliação do percentual do fármaco incorporado às nanopartículas;
- Análise da estrutura conformacional do BVZ;
- Avaliar a capacidade mucoadesiva dos sistemas através da reologia;
- Determinação do perfil de liberação *in vitro* do BVZ;
- Análise da citotoxicidade e permeabilidade *in vitro* do BVZ livre e incorporado nas nanopartículas, em monocamadas de células Caco-2;
- Análise da atividade anti-angiogênica através do ensaio de membrana corioalantóica (CAM) em ovos de galinha.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Principais matérias-primas e reagentes

Alta amilose (Hylon VII[®]; ~68 % amilose – National Starch & Chemical); ácido clorídrico, teor 37% (Quimis); ácido linoleico (Synth, Brasil); Ácido poliacrílico (carbopol[®] 974P NF polymer) (Lubrizol); cloreto de alumínio (AlCl₃) (Vetec); cloreto de sódio (NaCl) (Synth[®]); colesterol (Sigma-Aldrich[®]); fosfatidilcolina de soja (Sigma-Aldrich[®]); fosfato de potássio monobásico (Vetec); fosfato de sódio tribásico (Henrifarma); goma gelana (Kelcogel[®] CG-LA - NP Kelco); linhagem de células Caco-2 (SigmaAldrich[®]); tampão HEPES (SigmaAldrich[®]); mucina tipo II (Sigma-Aldrich[®]); ovos fertilizados; polissorbato 80; Avastin (Roche[®]) (Composição: fosfato de sódio 51 mM pH 6,2, 60 mg/mL de α,α -trehalose di-hidratada, 0,04% polysorbate 20); solução de antibióticos estreptomicina 100 μ g/mL/penicilina 100UI (Cultilab); solução de glutamina 200mM (Sigma Aldrich); solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM; soro fetal bovino (SigmaAldrich[®]); meio DMEM (Cultilab).

4.1.2 Cultura celular

Linhagem celular Caco-2 Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ n° 0059); Meio de cultura DMEM (do inglês Dulbecco's modified Eagle médium) (Gibco) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco), L-glutamina 2 mM, 1% de solução antimicótica-antibiótica (5 mg/mL penicilina, 5 mg/mL estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina), 4,5 g/L de glicose e 3,7 g/L de NaHCO₃; frascos de cultura celular e placa de 96 poços (Corning Inc.); Placas de 12 poços Transwell[™] (Corning) com suporte de policarbonato de 0,4 μ m de poro, e área de 1,12 cm², numa densidade de 5 x 10⁴ cel/cm²; reagente Azul de tripano (Sigma); solução salina balanceada de Hanks (HBSS); tampão fosfato salino (PBS).

4.1.3 Principais equipamentos

Agitador magnético (Quimis); analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator; analisador para calorimetria

exploratória diferencial (DSC), Mettler Toledo (Gieben, Suíça); analisador termogravimétrico, Mettler Toledo (Gieben, Suíça); autoclave (Fabbe[®], modelo 103); balança analítica (Owa labor; Bel Engineering); centrífuga (Sorvall TC); equipamento para ensaio de dissolução Hanson Research modelo New Hanson SR-8 Plus; fluorímetro F4500 (Hitachi); espectropolarímetro (Jasco J-815) acoplado a um sistema de controle de temperatura; analisador por microcalorimetria exploratória diferencial (nanoDSC) (TA Instruments); microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 200; estufa com circulação forçada de ar (Fabbe[®]); homogeneizador ultra-turrax (IKA); microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500F); microscópio-estereoscópio com dispositivo de captura e análise de imagens (Leica MZAPO); peagômetro (Micronal); refrigerador; reômetro Haake Rheostress 1, acoplado a um banho HAAKE C25P; fluxo laminar classe II tipo A1 (Veco[®], Campinas, Brasil); estufa (Forma Series II, Water Jacket CO₂ Incubator (ThermoFisher Scientific - Waltham, Massa chusetts, Estados Unidos).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção e caracterização físico-química dos polímeros

4.2.1.1 Retrogradação do amido

A retrogradação do amido foi realizada através da adaptação dos métodos propostos por Park e colaboradores (2009), Oliveira Cardoso e colaboradores (2017) e por Meneguín e colaboradores (2014), com adaptações. Dispersões aquosas de alta amilose (5%) em água purificada, previamente aquecidas (80°C), foram obtidas sob agitação mecânica (700 rpm) durante 15 minutos. Em seguida, essas dispersões foram submetidas à autoclavação (121°C/1 atm) durante 15 min, para gelatinização do amido. Ao final do processo de gelatinização o amido gelatinizado foi resfriado à 30 °C, sob agitação mecânica, e submetida ao processo de retrogradação em ciclos alternados de temperatura (4°C/30 °C) durante 16 dias (2 dias em cada temperatura).

4.2.1.2 Birrefringência das dispersões de amido

A birrefringência das dispersões de alta amilose, antes e após o processo de

retrogradação (item 4.2.1.1), foi analisada em microscópio óptico (Leica Microsystems, Inc., Germany), equipado com dois polarizadores, um posicionado sobre a amostra e outro localizado entre a objetiva e os tubos de observação. As fotomicrografias foram obtidas sob luz normal e luz polarizada, no aumento de 40x.

4.2.1.3 Determinação da massa molar dos polímeros utilizando espalhamento de luz estático

A massa molar ponderal média (M_w) e o segundo coeficiente virial (A_2) dos polímeros (GG e AR) foram determinados por meio da técnica de espalhamento de luz estático (SLS, do inglês, *Static Light Scattering*), em equipamento Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments), utilizando-se software Zetasizer nano ZS v7.11. O dn/dc (índice de refração diferencial do polímero em determinado solvente) dos polímeros (GG e AR) foi selecionado com base no valor adotado para polissacarídeos aniônicos ($0,146 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) (MORI; BARTH, 2013).

Para realização das medidas, foi utilizado como padrão interno o tolueno, previamente filtrado em membrana de politetrafluoretileno (PTFE, $0,2 \mu\text{m}$), pois devido à sua elevada pureza e R_θ (razão de luz espalhada pela amostra em relação à luz incidente) conhecido (MURPHY, 1997), é possível o alinhamento óptico mais preciso do equipamento por meio de uma medida da variação angular da intensidade de espalhamento (BANTLE; SCHMIDT; BURCHARD, 1982). O dimetilsulfóxido (DMSO) (90 %) e a água purificada utilizados para o preparo das dispersões de AR e GG, respectivamente, foram filtrados em membrana $0,2 \mu\text{m}$. A partir de uma dispersão dos polímeros (1 mg/mL) foram obtidas diluições de GG ($0,05$; $0,1$; $0,2$; $0,3$ e $0,4 \text{ mg/mL}$) e de AR ($0,025$; $0,05$; $0,2$; $0,3$ e $0,4 \text{ mg/mL}$). Para evitar qualquer tipo de contaminação por material particulado de qualquer natureza, todo processo de preparo das amostras foi realizado em capela de fluxo unidirecional (laminar) (VECO).

As medidas foram realizadas em temperatura de 25°C e os resultados foram obtidos a partir da equação de Rayleigh (Equação 1), que descreve a intensidade da luz dispersa a partir das moléculas do polímero presentes na solução aquosa (PUSKÁS et al., 2013).

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) P(\theta) \quad \text{Equação 1}$$

Em que, R_θ é a fração de Rayleigh determinada pela proporção entre luz dispersa e luz incidente

na amostra; M_w é a massa molar média da amostra; A_2 representa o segundo coeficiente virial; C é a concentração do polímero; $P(\theta)$ é a dependência angular da intensidade de espalhamento na amostra e K a constante ótica definida de acordo com a Equação 2:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \text{Equação 2}$$

Em que, N_A é a constante de Avogadro; λ o comprimento de onda do laser; n_0 índice de refração do solvente e o $\frac{dn}{dc}$ é incremento do índice de refração diferencial (MURPHY, 1997).

As medidas da intensidade de espalhamento foram realizadas em triplicata, resultando na construção do gráfico de Debye, correlacionando a concentração com a intensidade de espalhamento, que permite a determinação da massa molar média dos polímeros.

4.2.2 Desenvolvimento de nanopartículas reticuladas e não reticuladas

4.2.2.1 Preparo da dispersão de BVZ

A dispersão aquosa de BVZ (1 mg/mL) foi preparada a partir da diluição da solução comercial do fármaco (Avastin®) (25 mg/mL).

4.2.2.2 Preparo das dispersões de goma gelana e amido retrogradado

À partir das dispersões do AR, obtidas de acordo com o item 4.2.1.1, foram preparadas dispersões (1 mg/mL) em homogeneizador ultra-turrax (IKA) (11.000 rpm), por 20 minutos em temperatura ambiente.

Dispersões aquosas de goma gelana (GG) (1 mg/mL) foram preparadas sob agitação magnética (400 rpm), durante 30 minutos, na temperatura de 80°C.

4.2.2.3 Análise do PZ das dispersões poliméricas em função do pH

O estudo da influência do pH na carga superficial dos polímeros isolados foi realizado segundo método proposto por Picone e Cunha (2013), com adaptações. O teste, que baseia-se na titulação ácido-base dos polímeros (GG e AR), foi realizado em analisador de partículas

Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments), com ângulo de detecção de 173°, equipado com um Autotitulado MPT-2 (Multi Purpose Titrator), em temperatura de 25 °C. As medidas do PZ das dispersões poliméricas (1 mg/mL) foram obtidas através da titulação de NaOH (0,01 e 0,25M) e/ou HCl (0,1M). Neste estudo, foi explorada a faixa de pH de 1,2 a 7,4, consideradas biorrelevantes para o TGI, e o PZ foi medido em intervalos de 0,7 (no pH), com uma tolerância requerida de 0,1. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.2.2.4 Análise da influência das proporções de polímeros e fármaco na formação das nanopartículas

Para a otimização das condições de obtenção das nanopartículas, foi realizado um estudo preliminar com diferentes proporções da mistura de polímeros (1:1) e BVZ (1:9 à 9:1, v/v) (Tabela 1), considerando a concentração total de 0,5 mg/mL. O efeito da variação destas proporções na formação das nanopartículas foi avaliado.

As nanopartículas foram obtidas por complexação polieletrólítica, de acordo com o método proposto por Picone e Cunha (2013), com modificações. As dispersões poliméricas (GG e AR) foram preparadas separadamente, conforme item 4.2.2.1, e misturadas na proporção de 1:1 (v/v). Em seguida, foi preparada uma diluição do BVZ (1 mg/mL), e o pH da dispersão polimérica e da solução de BVZ foi ajustada para 6,2. As nanopartículas foram preparadas pela mistura dos poliânions GG/AR (1 mg/mL) a um volume de água MiliQ, seguida pela adição do polycation BVZ (1 mg/mL), de modo que as concentrações finais estão descritas na Tabela 1. A proteína foi adicionada por gotejamento, sob agitação magnética (400 rpm), a qual foi mantida por 10 min.

Tabela 1. Proporções de GG/AR e BVZ exploradas para formação das nanopartículas.

Proporções Polímeros: Fármaco	Concentração da mistura polimérica (GG:AR; 1:1, v/v) (mg/mL)	Concentração de BVZ (mg/mL)
1:9	0,05	0,45
2:8	0,1	0,4
3:7	0,15	0,35
4:6	0,2	0,3
5:5	0,25	0,25
6:4	0,3	0,2
7:3	0,35	0,15
8:2	0,4	0,1
9:1	0,45	0,05

Após a formação dos complexos, o diâmetro médio hidrodinâmico, PDI e PZ foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, do inglês *Dynamic Light Scattering* (DLS), em equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) a 25°C. As medidas foram realizadas em triplicata com 10 determinações do diâmetro para cada uma das amostras.

4.2.2.5 Planejamento fatorial completo 3^3 para obtenção das nanopartículas reticuladas

Com base nos resultados do estudo da influência das proporções de GG/AR e BVZ na formação de nanopartículas (item 4.2.2.4), foram selecionadas para o delineamento fatorial as formulações com maiores valores de PZ (em módulo) e menores valores de PDI. Os fatores, ou variáveis independentes, escolhidos para este estudo foram concentração da mistura polimérica (GG/AR) (variável 1 (v1)), concentração de BVZ (variável 2 (v2)) e de agente reticulante $AlCl_3$ (variável 3 (v3)), nos níveis baixa, médio e alta, os quais foram transformados em valores codificados -1, 0 e +1, respectivamente (Tabela 2). As respostas de interesse (variáveis dependentes) avaliadas foram diâmetro médio hidrodinâmico, PDI e PZ. Um planejamento fatorial (PF) do tipo completo 3^3 , com 27 experimentos e com ponto central (n=3), foi realizado com intuito de avaliar a influência das variáveis independentes sobre as respostas de interesse.

Para cada experimento, as amostras foram preparadas em triplicata. O planejamento fatorial (PF) do tipo completo 3^3 foi delineado e analisado utilizando-se o *software* livre Gui Octave v. 1.0.14, para avaliar a influência das concentrações de fármaco, polímeros e AlCl_3 na formação das nanopartículas reticuladas.

Tabela 2. Níveis dos fatores selecionados e respostas avaliadas no PF completo 3^3 .

Variáveis independentes (concentrações)	Níveis			Variáveis dependentes
	-1	0	+1	
Mistura polimérica (1:1, v/v)	0,15	0,25	0,35	Potencial Zeta
BVZ	0,15	0,25	0,35	Diâmetro médio
AlCl_3	0,015	0,02	0,025	PdI

Estudos preliminares foram realizados para determinar qual concentração de AlCl_3 utilizar na obtenção das nanopartículas. Com base nos dados obtidos, foram selecionadas três concentrações, 0,015 mg/mL, 0,02 mg/mL e 0,025 mg/mL de AlCl_3 , as quais correspondem a 5%, 6% e 7%, respectivamente, em relação a massa total de polímeros.

Para o preparo das nanopartículas reticuladas (Figura 14 a), seguiu-se procedimento descrito no item 4.2.2.4; no entanto, uma solução de AlCl_3 (1 mg/mL) foi previamente adicionada a solução de BVZ (Figura 14 b), de modo que ao final de cada preparação as concentrações finais de AlCl_3 foram 0,015 mg/mL, 0,02 mg/mL e 0,025 mg/mL. Em seguida, essa mistura foi adicionada por gotejamento à dispersão polimérica (GG/AR, 1:1, v/v) e o conjunto foi mantido sob agitação magnética (400 rpm) por 10 minutos. As concentrações finais da mistura polimérica, BVZ e AlCl_3 estão apresentadas na Tabela 2.

As concentrações de polímeros e fármaco foram previamente determinadas através das análises das proporções descritas no item 4.2.2.4.

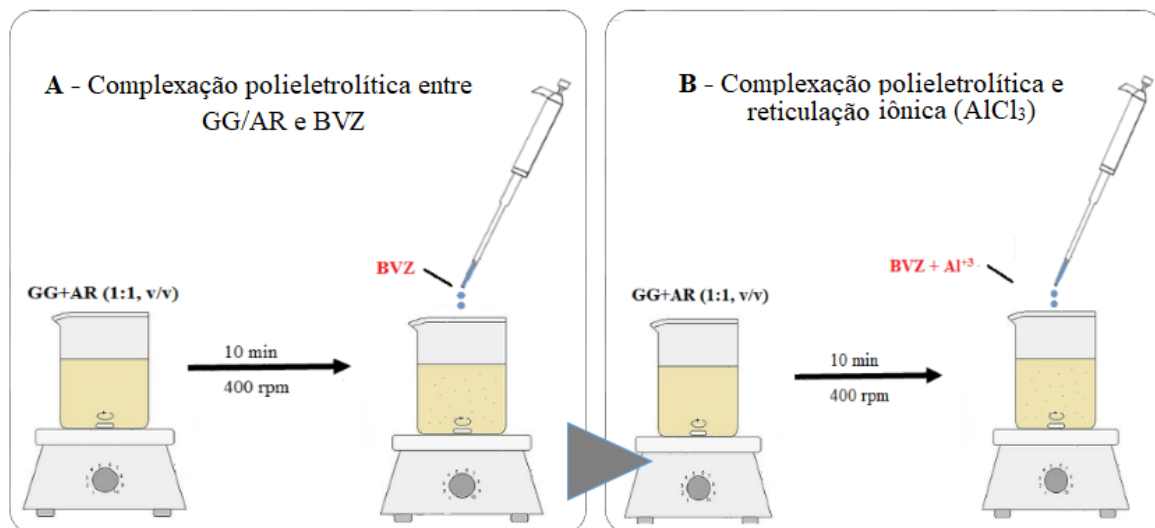


Figura 14. Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas não reticuladas (A) e reticuladas (B).

Fonte: autoria própria.

4.2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas reticuladas e não reticuladas

4.2.3.1 Análise do diâmetro médio hidrodinâmico e PDI

O diâmetro médio hidrodinâmico e PDI das nanopartículas reticuladas e não reticuladas foram determinados utilizando-se a técnica de DLS, em equipamento Zetasizer Nano-ZS em temperatura ambiente (25 °C), em um ângulo de detecção de 173°. À partir da relação de Stokes-Einstein (Equação 3) o equipamento é capaz de medir o movimento browniano das partículas em meio dispersante, ou seja, movimento em direções aleatórias provocado pela colisão entre as partículas. As informações sobre o diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos foram obtidas com o auxílio do software Zetasizer nano ZS v7.11. As medidas foram realizadas em triplicata, com 10 determinações para cada amostra.

$$Dh = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Equação 3}$$

Em que, Dh é o diâmetro hidrodinâmico, K a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio dispersante e D é o coeficiente de difusão.

4.2.3.2 Análise do PZ das nanopartículas

Para determinação do PZ das nanopartículas reticuladas e não reticuladas, foi utilizado analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS, sob ângulo de 173°, que através da equação de Smoluchowski (Equação 4), fornece informações sobre as flutuações da luz espalhada em razão da mobilidade eletroforética das partículas. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Zetasizer nano ZS v7.11 e as medidas foram realizadas em triplicata, com 10 determinações para cada amostra.

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon} \quad \text{Equação 4}$$

Em que, ζ é o potencial zeta, μ está relacionado a mobilidade eletroforética, η indica a viscosidade do meio dispersante e ε a constante dielétrica.

4.2.3.3 Análise da morfologia e tamanho das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

A morfologia e estrutura das nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-MEV) em equipamento Jeol JSM-7500F. As nanopartículas não-reticuladas e reticuladas, obtidos no item 4.2.2.4 e 4.2.2.5, respectivamente, foram diluídas (1:25, v/v) em uma dispersão de Tween 20 (0,25 %, v/v), para evitar a aglomeração das partículas durante o processo de secagem. As amostras foram dispostas em suporte metálico (substratos) e secas em dessecador por 3 dias. Para análise, o suporte contendo as nanopartículas secas foi submetido a um revestimento com material condutor (Carbono). Para obter as fotomicrografias e realizar as medidas de tamanho das nanopartículas foi utilizado o Software *Image J*.

4.2.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) com refletância total atenuada (ATR).

As análises foram realizadas em parceria com os Laboratório de Análises Químicas do Instituto de Química de Araraquara – IQ UNESP. Este estudo foi realizado com intuito de avaliar possíveis interações entre polieletrólitos após a complexação polieletrólítica e reticulação iônica.

Os espectros do BVZ, polímeros (GG e AR), nanopartículas reticuladas e não reticuladas, foram obtidos em espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier - VERTEX 70 (BRUKER), equipado com acessório para reflexão atenuada total (*Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)*), a uma resolução de 4 cm^{-1} , 64 scans, na região de $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$.

Para realização dos testes foram preparados 2 mL de solução de BVZ, da dispersão polimérica (GG e AR), e das nanopartículas reticuladas e não reticuladas em suspensão, que foram posteriormente congeladas ($-80\text{ °C}/24$ horas) e liofilizadas (por 24 horas) utilizando-se Liofilizador Micromódulo Thermo Scientific. Para liofilização das amostras foi utilizado crioprotetor (Trealose) (60 mg/mL), uma vez que o processo de congelamento pode afetar a estrutura de proteínas.

4.2.4 Validação da metodologia analítica para quantificação de BVZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A validação foi realizada seguindo as normas da ANVISA, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2017; ICH, 2005; USP, 2011). Os parâmetros de validação avaliados a partir da detecção por fluorescência foram: conformidade do sistema, linearidade, precisão intra e intercorrida, exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

Com objetivo de padronizar um método de quantificação do BVZ, incorporado às nanopartículas reticuladas e não reticuladas, bem como para os ensaios de dissolução e eficiência de incorporação, foi desenvolvido e validado um método analítico utilizando-se equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), modelo 1220 Infinity LC (Agilent Technologies), com amostrador automático e detector UV-Vis e Fluorescência, com os comprimentos de onda de excitação e emissão ajustados para 280 nm e 360 nm, respectivamente. As diluições foram obtidas a partir de uma solução estoque de BVZ (1,25 mg/mL) em água ultrapura (Milli Q) e as condições empregadas na metodologia estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Condições empregadas na metodologia analítica.

PARÂMETROS	
Fase estacionária	Coluna HPLC 250 x 4,6 mm; 3,6 µm Phenomenex C18, mantida a 80 °C.
Fase móvel	Água ultrapura (eluente A) e Acetonitrila (eluente B) ambos com 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA), nas proporções de 97:3 (v/v) em modo gradiente de 0 – 8 min, seguindo com modo isocrático até 13 min, até atingir proporção 10:90 (v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
λ de excitação e emissão (fluorescência)	280 nm e 360 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	80 °C
Tempo de corrida	13 Min

4.2.4.1 Conformidade do método cromatográfico

A conformidade é uma análise integrante dos ensaios analíticos realizada para assegurar a confiabilidade do método cromatográfico e, assim, assegurar que os parâmetros são apropriados para análise quantitativa do BVZ. Realizou-se a análise de seis injeções da solução de BVZ (200 µg/mL) preparada em fase móvel (Água+TFA (0,1%)), a partir da solução estoque de BVZ (1,25 mg/mL).

Para o desenvolvimento deste método analítico alguns parâmetros cromatográficos foram investigados como tempo de retenção (k) das áreas, fator de cauda (FC), números de pratos (N) e simetria do pico (10%), todos fornecidos pelo software OpenLab LC.

4.2.4.2 Especificidade/Seletividade

A especificidade foi avaliada a partir da comparação dos cromatogramas das amostras contendo possíveis substâncias interferentes (excipientes utilizados na composição do sistema), em comparação com a amostra contendo somente BVZ. Nesse sentido, para verificar a interferência dos polímeros e das nanopartículas no comprimento de onda de máxima absorção da proteína, a especificidade/seletividade foi determinada a partir da comparação entre os

resultados cromatográficos obtidos com a mistura polimérica (0,35 mg/m) e da mistura polímeros/ AlCl_3 (reticulante na concentração de 0,02 mg/mL). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4.3 Linearidade

A linearidade do método foi determinada a partir da construção de uma curva analítica do BVZ (área do pico *versus* concentração), partindo-se de uma solução estoque de BVZ (1,25 mg/mL). Foram preparadas oito diluições cujas concentrações variaram entre 20 e 350 $\mu\text{g/mL}$ (20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata. A linearidade foi avaliada utilizando-se a média dos valores das áreas obtidas e a equação da reta foi adquirida através do estudo da regressão linear utilizando-se o método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA) com auxílio do software livre Gui Octave v. 1.0.14.

4.2.4.4 Precisão

A precisão foi determinada por dois métodos, a precisão intracorrida (repetibilidade) e intercorrida (precisão intermediária), a partir de três injeções das soluções de BVZ nas concentrações 25, 200 e 350 $\mu\text{g/mL}$, obtidas a partir da solução estoque de BVZ (1,25 mg/mL). Para repetibilidade, as injeções foram realizadas no mesmo dia, sob condições de trabalho idênticas, enquanto na precisão intermediária, as análises foram realizadas por analistas diferentes e em dois dias diferentes, sob as mesmas condições experimentais. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores de desvio padrão relativo (DPR%) foram avaliados.

4.2.4.5 Exatidão

Para o ensaio de exatidão foram realizadas nove determinações de modo que foram avaliadas diluição de três concentrações diferentes, 50, 200 e 350 $\mu\text{g/mL}$ (baixa, média e alta, respectivamente), abrangendo a faixa de linearidade do método. As medidas foram realizadas em quintuplicata e o valor da concentração média obtida para cada nível foi comparado com o valor teórico, considerado 100%, e a exatidão foi calculada através da Equação 6, em que C expressa a concentração média determinada experimentalmente e C_t a concentração teórica correspondente.

$$\text{Exatidão (5)} = \frac{C}{C_t} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

4.2.4.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD e LQ foram determinados utilizando-se soluções de BVZ nas concentrações crescentes de 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g/mL}$, próximos ao limite inferior da curva analítica. Três curvas analíticas foram obtidas em triplicata e o LD e LQ foram calculados de acordo com a Equação 7 e 8, em que DP expressa o desvio padrão e α a inclinação da reta.

$$\text{LD} = \frac{\text{Dp}}{\alpha} \times 3 \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{LQ} = \frac{\text{Dp}}{\alpha} \times 10 \quad \text{Equação 8}$$

4.2.4.7 Robustez

A robustez é um parâmetro avaliado durante o desenvolvimento do método analítico e que representa a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Assim, a robustez foi avaliada a partir da injeção de uma diluição de BVZ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Os fatores considerados para análise da robustez foram variações na temperatura da coluna (78 °C e 80 °C) e no fluxo (0,8; 1,0 e 1,2 mL/min) (BRASIL, 2017).

4.2.5 **Eficiência de incorporação (EI %)**

A quantidade de BVZ incorporado foi avaliada pelo método indireto a partir da quantificação do BVZ livre no sobrenadante. Assim, após o preparo das nanopartículas reticuladas e não reticuladas, estes foram submetidos a centrifugação (15.000 rpm) em ultracentrífuga (Thermo Scientific), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e a proteína foi quantificada por CLAE, a partir da equação da reta da curva analítica obtida com método cromatográfico previamente validado (item 4.2.4). A determinação da EI (%) do fármaco nas nanopartículas foi calculada pela Equação 9, em que M_A indica a massa total do BVZ adicionado e M_Q é a massa de BVZ quantificado (livre no sobrenadante).

$$EI (\%) = \frac{M_A - M_Q}{M_A} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

4.2.6 Análises da estrutura conformacional do bevacizumabe

Diferentes técnicas foram exploradas para avaliar a conformação estrutural da proteína após a obtenção das nanopartículas reticuladas e não reticuladas e liberação do BVZ, já que a manutenção da estrutura de proteínas é de fundamental importância para garantir a eficácia e a segurança de produtos biofarmacêuticos.

4.2.6.1 Análise da estrutura secundária do BVZ por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As análises foram realizadas no laboratório multiusuário de análises químicas do Instituto de Química da UNESP de Araraquara. O equipamento utilizado foi o VERTEX 70 (BRUKER).

A estrutura secundária do BVZ incorporado as nanopartículas foi avaliada pela espectroscopia de absorção na região do IV por transformações de Fourier, equipado com acessório para reflexão atenuada total - ATR-FTIR (do inglês, *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Os espectros do BVZ livre e das nanopartículas reticuladas e não reticuladas foram obtidos a uma resolução de 4 cm^{-1} , 64 scans, na região de $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

Previamente ao teste, as nanopartículas e a solução de BVZ (1 mg/mL) foram preparadas, congeladas ($-80 \text{ °C}/24 \text{ horas}$) e liofilizadas (por 24 horas), em Liofilizador Micromódulo Thermo Scientific. Para liofilização das amostras foi utilizado crioprotetor (Trealose) (60 mg/mL), uma vez que o processo de congelamento pode afetar a estrutura de proteínas (JAIN; ROY, 2009). A escolha da Trealose com crioprotetor é devido a sua presença na composição do fármaco (Avastin[®]).

Para avaliar a estrutura secundária da proteína, utilizando-se o software Origin Pro 9.0, foi aplicada a segunda derivada aos espectros obtidos na faixa de $1700 \text{ a } 1500 \text{ cm}^{-1}$, relativa a região da banda de amida I, que está diretamente relacionada a estrutura secundária da proteína (SOUSA; SARMENTO; NEVES-PETERSEN, 2017).

4.2.6.2 Análise da estrutura terciária do BVZ por espectroscopia de fluorescência

As análises de fluorescência foram realizadas em parceria com o Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos (USP), sob a supervisão do Prof. Dr. Júlio César Borges utilizando-se fluorímetro F400 (Hitachi).

Para avaliar a estrutura terciária local do BVZ livre e incorporado às nanopartículas, utilizou-se como sonda a fluorescência intrínseca do triptofano. Os espectros foram obtidos utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 280 nm e acompanhou-se a emissão em comprimentos de ondas na faixa de 300 nm a 420 nm, a uma velocidade de 240 nm/min, fenda de excitação de 5 nm e de emissão de 10 nm, sob uma voltagem PMT 700 w. Amostras contendo a mesma concentração de polímero (0,35 mg/mL) e agente reticulante (0,015 mg/mL e 0,02 mg/mL) foram utilizadas como branco. As medidas de fluorescência de todas as amostras foram realizadas em triplicata, utilizando-se cubeta de quartzo de 10 mm. A partir dos espectros foi calculado o centro de massa espectral ($[\lambda]$) que reflete o grau de exposição do triptofano ao solvente aquoso (Equação 10).

$$[\lambda] = \frac{\sum Fi\lambda i}{\sum Fi} \quad \text{Equação 10}$$

Em que, λi corresponde aos comprimentos de onda utilizados para aquisição dos espectros de fluorescência; Fi é a intensidade de fluorescência em λi e $\sum Fi$ é a somatória de Fi .

4.2.6.3 Análise da desnaturação térmica do BVZ por microcalorimetria Exploratória Diferencial

As alterações estruturais devido à desnaturação térmica da proteína foram analisadas em equipamento de Microcalorimetria Exploratória Diferencial (nanoDSC) (TA Instruments, New Castle, DE), a uma taxa de aquecimento de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e faixa de aquecimento de $0 - 100^{\circ}\text{C}$. Imediatamente antes das análises todas as amostras foram degaseificadas, utilizando-se equipamento *Degassing Station* (TA instruments, USA). As curvas de nanoDSC obtidas para BVZ livre, mistura de polímeros (GG/AR) e nanopartículas reticuladas e não reticuladas foram avaliadas utilizando-se Software NanoAnalyze v. 2.1.13, o qual permitiu a aquisição de parâmetros termodinâmicos relacionados ao processo de desenovelamento proteico.

4.2.7 Análises térmicas

As análises térmicas de DSC e TG/DTG foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Edson A. Ticianelli do Grupo de Eletroquímica do Instituto de Química da USP de São Carlos.

4.2.7.1 Análises de DSC e TG/DTG

As curvas de DSC e de TG/DTG do BVZ, mistura polimérica (GG/AR) das nanopartículas foram registradas em equipamento Mettler Toledo (Gieben, Suíça) a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, na faixa de aquecimento de 30 °C à 500 °C. Os experimentos foram conduzidos utilizando cadinho de alumínio contendo aproximadamente 5 mg de amostra.

4.2.8 Estudo reológico para avaliação das propriedades mucoadesivas

4.2.8.1 Preparo das amostras

4.2.8.1.1 Preparo das dispersões de mucina

A mucina (tipo II; Sigma-Aldrich®) foi dispersa em água MilliQ (5%; m/v), sob agitação magnética (700 rpm) durante 3 horas, em temperatura ambiente (~25 °C).

4.2.8.1.2 Preparo da mistura nanopartículas/mucina

Após o preparo das dispersões de mucina (5 %), 5 mg das nanopartículas reticuladas e não reticuladas liofilizadas foram adicionadas à dispersão de mucina, sob agitação magnética (700 rpm), por 30 min. Em seguida, as misturas permaneceram em repouso por 30 min, antes da realização das medidas reológicas

4.2.8.2 Ensaios oscilatórios dinâmicos

Os ensaios oscilatórios dinâmicos foram realizados em reômetro *Discovery Series Hybrid Rheometer* (DHR-1) (TA Instruments Ltd. Leatherhead, UK), acoplado a um banho

termostatizado (Malgene[®]) em temperatura de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Os testes foram realizados utilizando-se geometria cone-placa (SST ST) de 40 mm, com ângulo $2\ \mu\text{m}$ e *gap* fixo de $52\ \mu\text{m}$. As medidas foram obtidas pelo software *HRI – 5332-1380: TA Instruments Trios v.4.1.0.31739*.

Os testes foram conduzidos com as misturas de nanopartículas/mucina em diferentes valores de pH (1,2 e 6,8), os quais foram considerados biorrelevantes para o TGI. Antes da realização de cada medida, as amostras foram mantidas em repouso sobre a placa do reômetro por 3 minutos, a $37\ ^\circ\text{C}$. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.8.2.1 Determinação da região de viscoelasticidade linear

A região de viscoelasticidade linear, para a seleção da tensão a ser empregada nas análises de varredura de frequência, foi determinada para cada amostra, a partir da varredura de tensão, na faixa de $0,1 - 10\ \text{Pa}$, em frequência fixa de $1\ \text{Hz}$.

4.2.8.2.2 Determinação dos espectros mecânicos (varredura de frequência)

Os espectros mecânicos foram obtidos variando-se a frequência oscilatória na faixa entre $0,1$ e $100\ \text{Pa}$, sob tensão constante previamente determinada a partir da região de viscoelasticidade linear de cada amostra ($0,003 - 10\ \text{Pa}$). Foram avaliados os módulos G' (módulo elástico ou de armazenamento) e G'' (módulo viscoso ou de perda), em função da frequência.

4.2.8.2.3 Avaliação das propriedades mucoadesivas através do cálculo do módulo de interação

A partir da determinação dos módulos G' e G'' (item 4.2.7.2.2) das dispersões de mucina e das misturas de nanopartículas/mucina, o sinergismo reológico foi determinado através do cálculo do módulo ou termo de interação ($\Delta G'$) das misturas (Equação 11). (HAGERSTROM et al., 2000).

$$G'_{\text{mis}} = G'_{\text{nano}} + G'_{\text{muc}} + \Delta G'$$

Equação 11

Em que, G'_{mis} , G'_{nano} e G'_{muc} são os módulos elásticos da mistura nanopartículas/mucina, das nanopartículas e da mucina, respectivamente e o $\Delta G'$ é o módulo de interação entre as misturas.

4.2.9 Estudo de dissolução do BVZ

4.2.9.1 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do BVZ

O perfil de liberação *in vitro* do BVZ livre e incorporado às nanopartículas reticuladas e não reticuladas foi avaliado em HCl 0,1 N (pH 1,2) durante 120 minutos e tampão fosfato (pH 6,8), por 240 minutos, a fim de mimetizar o gradiente de pH ao longo do TGI. Uma massa pré-determinada do BVZ livre e das nanopartículas liofilizadas (NP1, NP1R1, NP1R2 e NP3) respectiva a 0,6 mg de BVZ foi adicionada à 1,5 mL dos respectivos meios de dissolução em tubos *ependorf* e incubados em incubadora com agitação orbital (digital shaker MA 420 – Marconi®), à $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, sob agitação de 60 rpm, de acordo método proposto por Ferreira e colaboradores (2017), com modificações. As condições *sink* foram mantidas durante todo teste.

As coletas foram realizadas em tempos pré-determinados (15, 30, 60 e 120 min para HCl pH 1,2 e 15, 30, 60, 120, 240 min para tampão fosfato pH 6,8) e o meio coletado foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,20 μm . A quantidade de fármaco liberada foi quantificada por meio do método analítico previamente desenvolvido e validado em CLAE (item 4.2.4). Os testes foram realizados em triplicata para cada meio de dissolução e cada tempo de coleta.

4.2.9.2 Análise da cinética de liberação do fármaco

Os mecanismos envolvidos no processo de liberação do fármaco foram avaliados através da aplicação dos diferentes modelos matemáticos (Primeira ordem, Weibull, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hixon & Crowell) aos dados de liberação, utilizando o *software* Sigma Plot 10.0.

4.2.10 Análise da estrutura secundária do BVZ por Dicroísmo Circular após a incubação em meio ácido (pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,8)

As análises por dicroísmo circular (DC) foram realizadas em parceria com o Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos (USP),

sob a supervisão do Prof. Dr. Júlio César Borges, utilizando-se equipamento espectropolarímetro (Jasco J-815), acoplado a um sistema Peltier de controle de temperatura.

Os espectros foram obtidos na faixa de 200 – 260 nm, em temperatura de 25 °C, utilizando-se tempo de resposta de 2 s, *data pitch* (número de pontos avaliados durante o *scan*) de 0,5 nm, velocidade de aquisição de 50 nm/min e cubeta de quartzo de 0,1 cm. O volume de amostra utilizada foi de aproximadamente 250 µL e todos os espectros foram obtidos com a média de 36 varreduras. Foram avaliados as nanopartículas reticuladas e não reticuladas, contendo concentrações conhecidas do BVZ (0,15 mg/mL e 0,35 mg/mL) e o BVZ livre (0,15 mg/mL e 0,35 mg/mL).

Para avaliação da estrutura secundária do BVZ, as nanopartículas e proteína livre foram previamente incubados em HCl 0,1 N pH 1,2 e tampão fosfato pH 6,8, em tubos *ependorf*, os quais foram colocados em incubadora com agitação orbital (digital shaker MA 420 – Marconi®), em 37,0 ± 0,1°C, sob agitação de 60 rpm, de acordo da metodologia descrita para o ensaio de dissolução. Após 120 min de incubação em HCl pH 1,2, e 240 min em tampão fosfato pH 6,8, uma alíquota (1 mL) foi retirada, filtrada em membrana de acetato de celulose 0,45 µm e a quantidade de fármaco liberado foi quantificada em CLAE utilizando-se um método analítico previamente validado (item 4.2.4).

Os espectros dos meios HCl 0,1 pH 1,2 e do tampão fosfato pH 6,8 foi subtraído dos espectros das nanopartículas, por meio do tratamento dos dados no software OriginPro 2015 v. 9.2.257. As análises foram realizadas em triplicata. Os valores obtidos foram normalizados pela elipticidade residual molar (θ) descrita pela Equação 12:

$$\theta = \frac{(\theta \times 100 \times MM)}{(c \times l \times n)} \quad \text{Equação 12}$$

Em que, θ é a elipticidade em graus (Deg), MM é a massa molar da proteína (g/mol), c é a concentração da proteína (mg/mL), l é o caminho óptico (cm) e n é o número de resíduos de aminoácidos.

O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi estimado pelo software CDNN Deconvolution.

4.2.11 Ensaios Celulares

Os ensaios celulares foram realizados em parceria com o Departamento de Ciências

Biológicas da FCFAR-UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, com a colaboração do doutorando Roni De Grandis.

4.2.11.1 Cultivo da célula Caco-2

Células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ nº 0059) foram cultivadas em meio de cultura Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco), L-glutamina 2 mM, 1% de solução antimicótica-antibiótica (5 mg/mL penicilina, 5 mg/mL estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina), 4,5 g/L de glicose e 3,7 g/L de NaHCO₃. Todos os experimentos foram realizados em fluxo laminar classe II tipo A1 (Veco[®], Campinas, Brasil) e mantidas em estufa (Forma Series II, Water Jacket CO₂ Incubator (ThermoFisher Scientific - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos)) com 5% de CO₂, a 37°C e 95% de umidade, de acordo com os procedimentos para manutenção de linhagens celulares propostos por BAL-PRICE & COECKE (2011). Os experimentos foram conduzidos entre a terceira e a oitava passagem, após o descongelamento, com subcultivos a cada 3-4 dias para manter o seu crescimento exponencial. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan e apenas as culturas com viabilidade superior ou igual a 90% foram utilizadas nos experimentos.

4.2.11.2 Ensaio de Viabilidade Celular em monocamadas de células Caco-2

A atividade do BVZ livre e incorporado às nanopartículas reticuladas e não reticuladas foi avaliada utilizando-se como substância indicadora o cloridrato de resazurina (Sigma-Aldrich), que possui potencial redox (óxido-redução), com mudança colorimétrica e indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular de acordo com o protocolo de Page e colaboradores (1993). As células foram semeadas em microplacas de 96 poços obtendo uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo (5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade), durante 24 horas para permitir a aderência celular. Para o teste, as amostras foram preparadas, liofilizadas, ressuspensas em água e as diluições foram realizadas em microplaca, obtendo-se concentrações de 25 - 300 µg/mL. Como controle positivo foram utilizadas as células tratadas com metilmetanosulfonato (MMS, 300 µM) e para controle negativo as células sem qualquer tipo de tratamento. Novamente as células foram incubadas por 4 e/ou 24 horas e após esse período, o meio de cultura foi removido. Em seguida, foram adicionados 50 µL de cloridrato de resazurina 0,01% (m/v) e as placas foram

novamente incubadas por 2 horas. As leituras da fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro CaryEclipse (Agilent Technologies - Santa Clara, EUA) nos comprimentos de excitação e emissão de 560 e 590 nm, respectivamente.

4.2.11.3 Resistência elétrica transepitelial (TEER)

Previamente ao ensaio de permeabilidade, a monocamada de células foi lavada com solução balanceadas Hank's (Gibco), contendo 200 mM de HEPES (Sigma) com pH ajustado para 7,4. As células foram mantidas neste tampão por 20 minutos a 37° C e, em seguida, as medidas de TEER (do inglês, *transepithelial electrical resistance*) ($\Omega \times \text{cm}^2$) foram realizadas sob o sistema Transwell®, utilizando-se um minivoltímetro Millicell ERS® - Millipore, através da inserção do eletrodo no compartimento basolateral e compartimento apical, como mostra a Figura 15. As medidas foram realizadas nos 10º, 15º e 21º dias de cultivo (YU; HUANG, 2011), com intuito de avaliar a integridade das monocamadas, e os resultados de TEER > 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ foram consideradas adequadas para os estudos de permeabilidade (FERNANDES et al., 2015).

4.2.11.4 Permeabilidade intestinal in vitro em monocamadas de células Caco-2

Para o ensaio de permeabilidade, as concentrações das amostras e dos controles foram determinadas nos ensaios de citotoxicidade, garantindo a viabilidade da monocamada.

Os estudos de permeabilidade em células Caco-2 foram realizados com solução de BVZ livre (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e com as nanopartículas reticuladas e não reticulada (NP3, NP1R1 e NP1R2) contendo 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BVZ. Após a lavagem com tampão Hank's e realização das medidas de TEER, os experimentos foram iniciados a partir da adição de 1,0 mL de tampão de Hank's pH 7,4 no compartimento basolateral (receptor), e de 500 μL das nanopartículas (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e do BVZ livre (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dispersos em tampão Hank's nos compartimentos apicais (doador) das placas Transwell®. Como controles de permeabilidade e da integridade da monocamada foram utilizadas soluções padronizadas de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloridrato de verapamil (Sigma) e fluoresceína (Sigma), como marcadores padrões de transporte transcelular e paracelular, respectivamente.

As placas foram mantidas sob agitação, incubadora com agitação orbital (digital shaker MA 420 – Marconi®), à $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, sob agitação de 25 rpm. Nos tempos pré-determinados (0, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min), alíquotas de 200 μL das amostras foram coletadas a partir do compartimento basolateral, seguida pela reposição de 200 μL de tampão de Hank's fresco, mantido a 37° C, com a finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento.

A permeação do BVZ para o compartimento basolateral foi detectada por CLAE. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados foram expressos em porcentagem de permeabilidade, porcentagem de fármaco no compartimento apical do inserto.

Calculou-se também a permeabilidade aparente (P_{app}) utilizando a Equação 13.

$$P_{app} (cm.s) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A.C_0} \quad \text{Equação 13.}$$

Em que, dQ/dt representa o fluxo do fármaco do lado mucosal para o lado serosal; C_0 , é concentração inicial de BVZ no compartimento luminal e A é a área da membrana, a qual corresponde à $A = \text{extensão} \times \text{diâmetro}$.

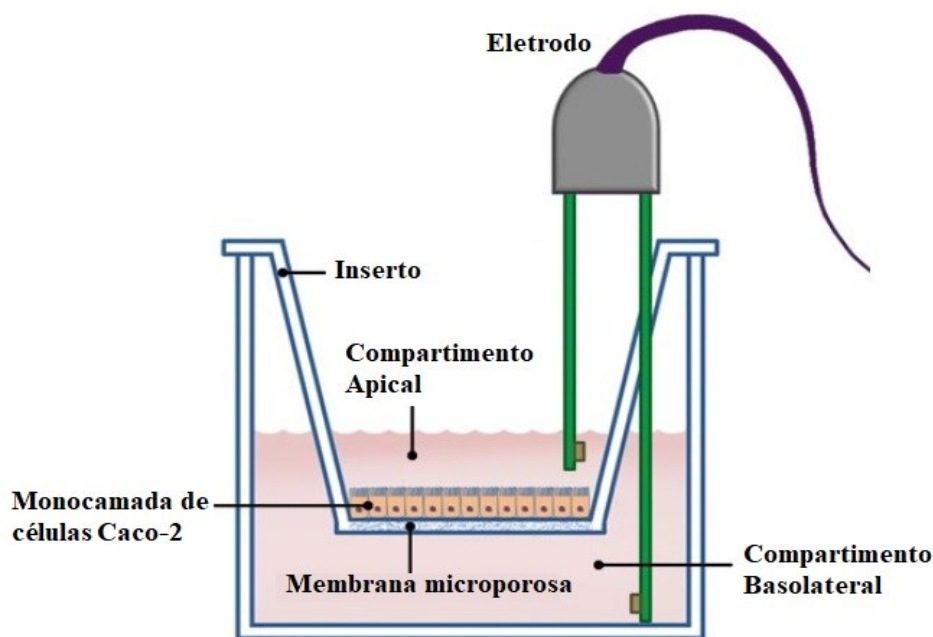


Figura 15. Esquema ilustrativo da medida de resistência transepitelial (TEER) em monocamadas de células Caco-2, utilizadas nos estudos de permeabilidade.

Fonte: Adaptado de: ALI; RYTTING (2014).

4.2.12 Análise da atividade anti-angiogênica utilizando modelo membrana corioalantóica (CAM) em ovos de galinha

As análises utilizando a CAM foram realizadas em parceria com o Centro de Pesquisa em Ótica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos (USP), sob a supervisão do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e colaboração da Dra. Hilde Buzzá.

Um total de 150 ovos de galinha fertilizados foram fornecidos pela granja da empresa

Cardoso, V. M. O.

A'doro SA (São Carlos, SP, Brasil). No primeiro dia do desenvolvimento embrionário (ED, do inglês *embryo development*) os ovos foram limpos com álcool 70 % e, em seguida, incubados verticalmente (37°C e 70% de umidade relativa), por um período de 3 dias. Durante esse período, os ovos foram mantidos em um suporte que efetua meia rotação a cada 30 min, com intuito de evitar a formação de membrana na casca do ovo.

No terceiro dia do experimento (ED3), a rotação foi interrompida, e antes de realizar a abertura do orifício nos ovos, estes foram novamente limpos com álcool 70 % e, sob o fluxo laminar e condições assépticas, foram abertas janelas circulares (aproximadamente 2 cm²) na casca dos ovos, possibilitando o acesso à CAM e a retirada de 3-4 mL de albumina (com agulha 25G e seringa). Posteriormente, esses orifícios foram selados com a utilização de uma fita transparente (Fita adesiva mágica 25x65 Scotch[®] 3M), para evitar a desidratação e contaminação dos ovos, que foram novamente colocados na estufa até o sexto dia do experimento (ED6), em que foram adicionadas 200 µL de cada formulação.

Seis grupos experimentais (n = 3) foram testados onde os ovos foram incubados com o soro fisiológico (0,9 %), utilizado como controle negativo, soluções do BVZ, nas concentrações de 0,15 mg/mL e 0,35 mg/mL como controles positivos, a dispersão polimérica (GG/AR (1:1), 1 mg/mL), as amostras não reticuladas (NP1 e NP3) e reticuladas (NP1R1 e NP1R2).

Foram registradas imagens da vascularização, utilizando-se uma câmera com aumento de até 200x (USB Digital Microscope - AVANTGARDE, China), sempre antes da adição das amostras e a cada 24 horas.

As etapas experimentais seguiram os princípios éticos da experimentação animais, após a análise e aprovação do projeto pelo Comitê de ética no uso de animais da USP - IFSC (CEUA/IFSC-USP parecer nº 7210310718) (documento em anexo).

Uma análise qualitativa dos dados foi feita considerando o tempo de viabilidade dos ovos e pela análise das imagens obtidas pós aplicação da formulação comparada à imagem anterior. Uma análise quantitativa também foi realizada a partir das imagens, usando *software ImageJ v. 1.48* e a medida dos diâmetros e comprimentos de cada vaso individualmente. A partir dos valores obtidos, um histograma com distribuição do número de vasos foi construído com o uso do *software Origin 9.0*, para avaliação da resposta correlacionando diâmetro do vaso com seu respectivo comprimento. Essa análise foi realizada para cada imagem em cada tempo pós aplicação, sempre usando como referência os valores encontrados no primeiro dia do ensaio (imagem realizada antes da aplicação das amostras).

A viabilidade dos ovos foi verificada antes da aplicação das amostras e todos os dias

durante o experimento, através da observação da membrana, que apresenta cor amarelada pela ausência de vasos sanguíneos, caso o embrião esteja inviável. Nesse caso, eles foram retirados da estufa, colocados na geladeira e, posteriormente, devidamente descartados no Incinerador Público de São Carlos. Os ovos viáveis submetidos aos procedimentos experimentais foram descartados da mesma maneira ao final dos testes.

O protocolo foi realizado com os embriões até o 14º do desenvolvimento embrionário, usando como base o que estabelece a recomendação norte americana *Policy for Use of Avian Embryos Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC; USA). O artigo 2 dessa norma (IACUC/item 2) define textualmente que “embriões de galinha mais jovens que 15 dias (ED15) são considerados incapazes de sentir dor (não susceptíveis à experiência nociceptiva), recomendando que os embriões mais jovens (ED14 ou menos) sejam submetidos a eutanásia por meio da hipotermia, tipicamente pela disposição dos ovos em freezer a -20 °C”.

4.2.13 Análise estatística

Quando aplicável, as diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software *Origin 9.0*, *Statistica 10.0*, *GraphPad Prism 5* e *Sigma Plot 10.0*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização físico-química dos materiais poliméricos

5.1.1 Retrogradação do amido

A retrogradação é uma técnica amplamente empregada para melhorar as propriedades físico-químicas do amido (solubilidade, intumescimento, propriedades reológicas, mucoadesividade, resistência enzimática) (ASHWAR et al., 2016; CHUNG et al., 2006; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017; ZHOU et al., 2010) para promover modificações físico-químicas no amido, levando a formação de um novo material, com propriedades moduláveis, o qual pode ser utilizado para aplicações específicas. A taxa de retrogradação depende de vários fatores, incluindo a origem, tipo e concentração do amido, o tempo e a temperatura de aquecimento e resfriamento (WANG; COPELAND, 2013).

No processo de retrogradação (Figura 16), na etapa de gelatinização, o aquecimento do amido em excesso de água promove a absorção de água e o intumescimento dos grânulos, levando a quebra das ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas e rompimento dos grânulos, perturbando a estrutura granular que perde sua organização molecular e, conseqüentemente, a birrefringência. O intumescimento contínuo leva a um fenômeno irreversível de ruptura dos grânulos e lixiviação dos polímeros (amilose e amilopectina) para fora da estrutura, resultando no visível aumento da viscosidade. Possivelmente, a gelatinização aconteça primeiro nas regiões amorfas (cadeias amilose), onde as ligações de hidrogênio são menos numerosas e o polímero mais susceptível a dissolução. Por outro lado, o aquecimento contínuo promove a gelatinização das regiões cristalinas (amilopectina) (CEREDA et al., 2001).

Durante a retrogradação, com o resfriamento do amido gelatinizado, as cadeias de amilose e amilopectina perdem energia e tendem a se reassociar e, através de interações supramoleculares (ligações de hidrogênio e forças de van der Waals), passam por um processo de reorganização estrutural e recristalização, resultando na formação de zonas de junção entre as moléculas que originam estruturas, completa ou parcialmente ordenadas, as quais diferem dos grânulos nativos (BEMILLER, 2011; DONA et al., 2010; HARALAMPU, 2000; HOOVER et al., 2010; LIU et al., 2005; POLES, 2009; WANG; COPELAND, 2013; WANG et al., 2015).

A retrogradação é um processo irreversível em que ocorre a transição do estado altamente intumescido e solubilizado do amido (amido gelatinizado) para o estado insolúvel, contraído e semicristalino (POLESI, 2009).

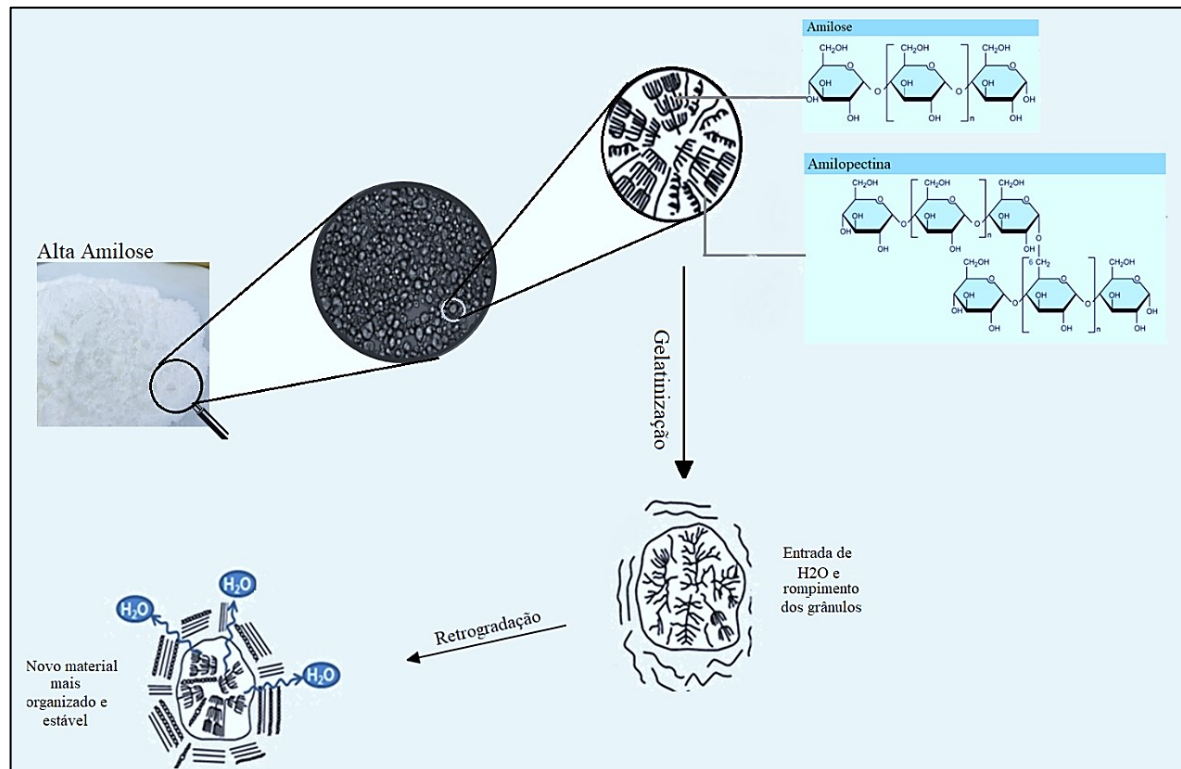


Figura 16. Etapas da gelatinização e retrogradação da alta amilose (High amylose – Hylon VII).

Fonte: Adaptado de FOOD-INFO. Starch. Disponível em: <http://www.food-info.net/uk/carbs/starch.htm>. Acesso em 02/02/2018.

O método de retrogradação utilizado neste estudo (ciclos térmicos alternados durante 16 dias), baseado no procedimento proposto por Park e colaboradores (2009) foi previamente explorado em outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa e demonstrou ser eficiente para a obtenção de um material com elevado teor de amido resistente (> 50%) (CARDOSO, 2014; MENEGUIN et al., 2014). Os estudos evidenciaram ainda que a retrogradação resultou em um material com maior adesividade e com a presença de estruturas cristalinas do tipo B (duplas hélices) e tipo V (hélices simples) diferentemente do amido nativo (alta amilose - Hylon VII®).

A recristalização lenta e contínua do amido, ao longo dos 16 dias de retrogradação, favoreça uma maior reorganização estrutural levando a reassociação das cadeias poliméricas em um estado mais ordenado. Park e colaboradores (2009), com base nas análises de DSC, sugeriram que a retrogradação em ciclos alternados de temperatura durante 16 dias, resulta na formação de cristais imperfeitos (durante o armazenamento em baixa temperatura - 4 °C), os

quais se fundem quando armazenados em 30 °C. Assim, essa sequência de eventos permite que os cristais formados tornem-se cada vez mais perfeitos, e ao final do processo uma rede estrutural de elevado nível de organização seja formada.

Durante a retrogradação, a amilose é capaz de recrystalizar mais rapidamente, em relação a amilopectina, e se reassociar formando estruturas em duplas hélices, estabilizadas por ligações de hidrogênio, originando estruturas cristalinas termicamente mais estáveis (DENARDIM E SILVA, 2008). Os cristalitos formados ficam embebidos em uma matriz amorfa que dificulta o acesso de enzimas digestivas (DIMANTOV et al., 2004; HTOON et al., 2009). Assim, o elevado conteúdo de amido resistente obtido a partir da retrogradação da alta amilose (Hylon VII), representa um material promissor para o desenvolvimento de sistemas para liberação colônica de fármacos, devido a sua potencial capacidade de ser metabolizado somente por enzimas colônicas, escapando da digestão no estômago e intestino delgado (DIMANTOV et al., 2004; HTOON et al., 2009; WALTER; SILVA; DENARDIN, 2005).

5.1.2 Birrefringência das dispersões de alta amilose, amido gelatinizado e amido retrogradado

Devido à sua natureza semicristalina, os grânulos de amido exibem diferentes níveis de organização, os quais são responsáveis pelas propriedades de birrefringência e cristalinidade desse material. A alta amilose (Hylon VII) é um homopolissacarídeo semicristalino constituído por cadeias de amilose (regiões amorfas) e amilopectina (regiões cristalinas) (DENARDIN; SILVA, 2009; DONA et al., 2010; PARAGINSKI et al., 2014; SINGH et al., 2003), e devido ao seu elevado conteúdo de amilose (~68 %) é capaz de, após a retrogradação, originar uma estrutura organizada em que os cristalitos estão distribuídos ao longo de uma matriz amorfa (DIMANTOV et al., 2004; HTOON et al., 2009).

A refração através dos domínios cristalinos resulta em uma estrutura típica de “Cruz de Malta”, caracterizada pela orientação radial das macromoléculas, centralizada no “hilum” (centro da cruz), região considerada como ponto de crescimento do grânulo (ELIASSON, 2004; PASCOAL, 2014).

As fotomicrografias das dispersões de alta amilose em água, antes e após a gelatinização, e após a retrogradação estão apresentadas na Figura 17.

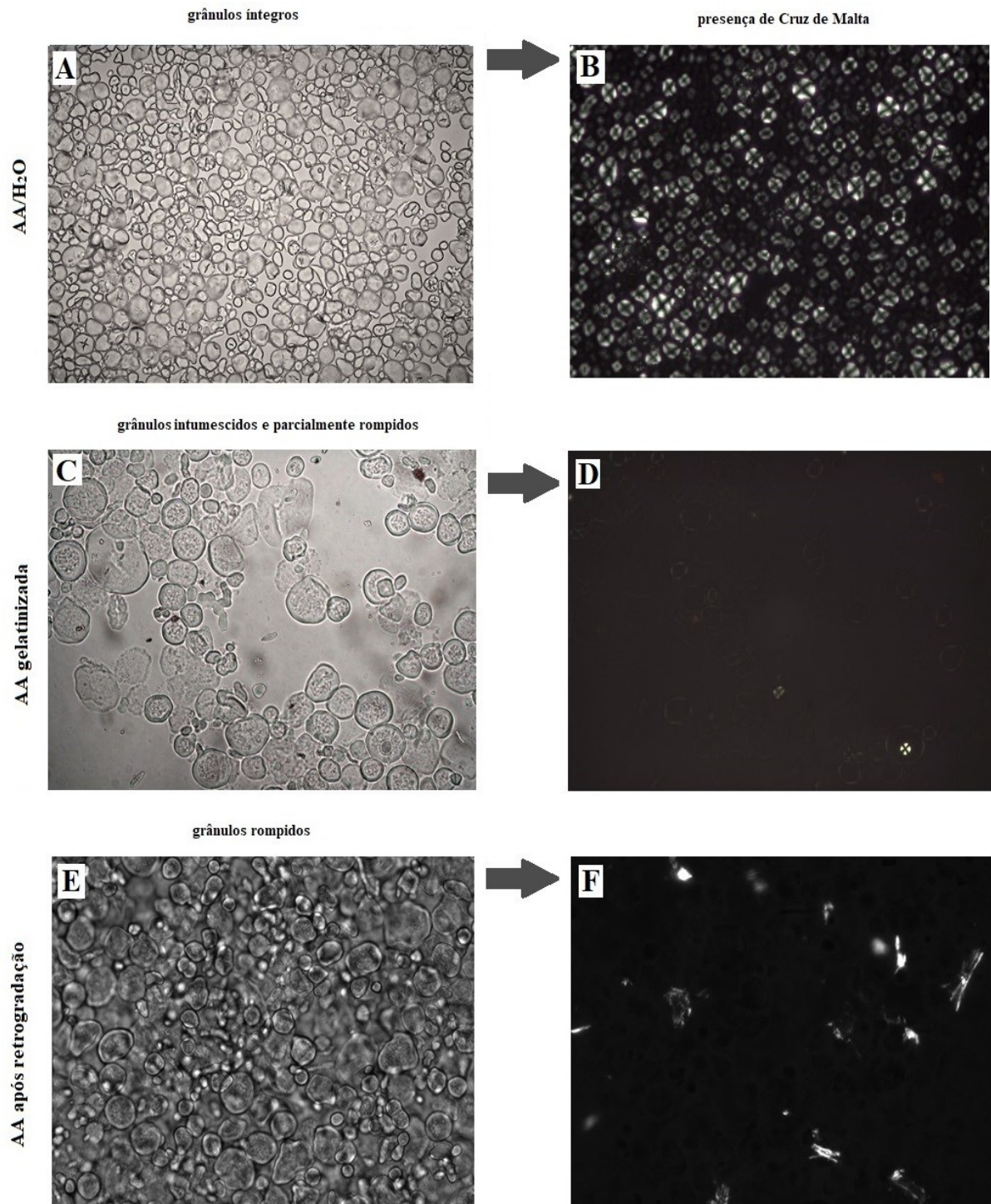


Figura 17. Fotomicrografias dos grânulos de alta amilose antes e após a gelatinização, e ao final do processo de retrogradação, sob luz normal (A, C e E) e luz polarizada (B, D e F).

Para a alta amilose (AA) dispersa em água em temperatura ambiente, verificou-se a presença dos grânulos íntegros (Figura 17 A), cujas características não foram perdidas, uma vez que o comportamento birrefringente com “Cruzes de Malta” bem definidas (Figura 17 B) foi evidenciado. Essa birrefringência refere-se ao elevado grau de organização das macromoléculas

arranjadas em orientação radial no interior dos grânulos, uma característica inerente ao amido, de acordo com Biliaderis (2009) e Dernardim e Silva (2009).

Após a gelatinização da alta amilose, através do tratamento hidrotérmico (121 °C/15 min), as imagens revelaram a presença simultânea de grânulos íntegros intumescidos e rompidos (Figura 17 C), provavelmente devido a heterogeneidade de cristais presentes nos grânulos, os quais se fundem em temperaturas diferentes.

A quantidade de “Cruz de Malta” diminuiu, provavelmente devido a fusão de cristalitos e perda da organização estrutural o que, conseqüentemente, resulta na redução da birrefringência (Figura 17 D), sendo essa redução mais evidente no centro do grânulo (“hilum”), pois segundo Singh e colaboradores (2003), a gelatinização ocorre inicialmente no “hilum” e tende a se expandir para a periferia, de modo que o processo ocorre primeiro nas regiões amorfas, devido a fragilidade das ligações de hidrogênio nessa região.

As fotomicrografias do AR revelaram um material com maior quantidade dos grânulos rompidos (Figura 17 E), enquanto a microscopia de luz polarizada exibiu uma menor birrefringência, comparada a alta amilose em dispersão e gelatinizada, com a presença de diferentes tipos de estruturas cristalinas (Figura 17 F). Esse comportamento não necessariamente indica que houve a amorfização do material, mas sim, que após o processo de retrogradação, as cadeias de amilose e amilopectina recristalizaram formando estruturas parcialmente ordenadas, com um nível de organização diferente daquele observado nos grânulos íntegros, onde as moléculas de amilopectina estão arranjadas radialmente (WANG et al., 2015).

5.1.3 Determinação da massa molar média dos polímeros utilizando espalhamento de luz estático (SLS)

O SLS é uma técnica muito utilizada na caracterização de materiais poliméricos e mede o excesso de intensidade da luz dispersa por uma solução em relação à intensidade da luz espalhada por um solvente puro (MERTINS, 2008). A partir do conhecimento do incremento do índice de refração (dn/dc) de um sistema polímero-solvente é possível, através da técnica de SLS, determinar a massa molar ponderal média e o segundo coeficiente virial (A_2) dos materiais.

A massa molar média dos polímeros representa o tamanho da cadeia do polímero e é um parâmetro importante capaz de influenciar diretamente as propriedades físicas desses

materiais (BRUNER; DAUSKARDT, 2014). O A_2 é uma propriedade importante que descreve a magnitude da interação entre solvente e a cadeia polimérica, ou seja, interações polímero-polímero e polímero-solvente (MURPHY, 1997). O A_2 pode assumir valores positivos ou negativos, os quais estão diretamente relacionados às forças atrativas ou repulsivas entre as partículas, além de permitir avaliar como essas interações podem ser influenciadas por diferentes solventes (ENOKI, 2010).

Dentro do contexto da nanotecnologia, o conhecimento da massa molar média de materiais poliméricos é fundamental, uma vez que esse parâmetro pode afetar os mecanismos de formação e a estabilidade das nanopartículas, além de influenciar no tamanho da partícula, na eficiência de encapsulação de fármacos, nas interações físico-químicas, na taxa de liberação do fármaco aprisionado e nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco liberado a partir de nanocarreadores (GUPTA, 2016; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Considerando que a intensidade da luz dispersa através das partículas, em um meio dispersante, é proporcional a sua concentração, os valores de massa molar média foram determinados a partir da intensidade da luz espalhada ($Kc/R\theta$) medida em várias concentrações, a um determinado ângulo. Sendo assim, o intercepto no gráfico de Debye ($Kc/R\theta$ versus a concentração) (Figura 18) representa a massa molar média e a inclinação da reta o A_2 .

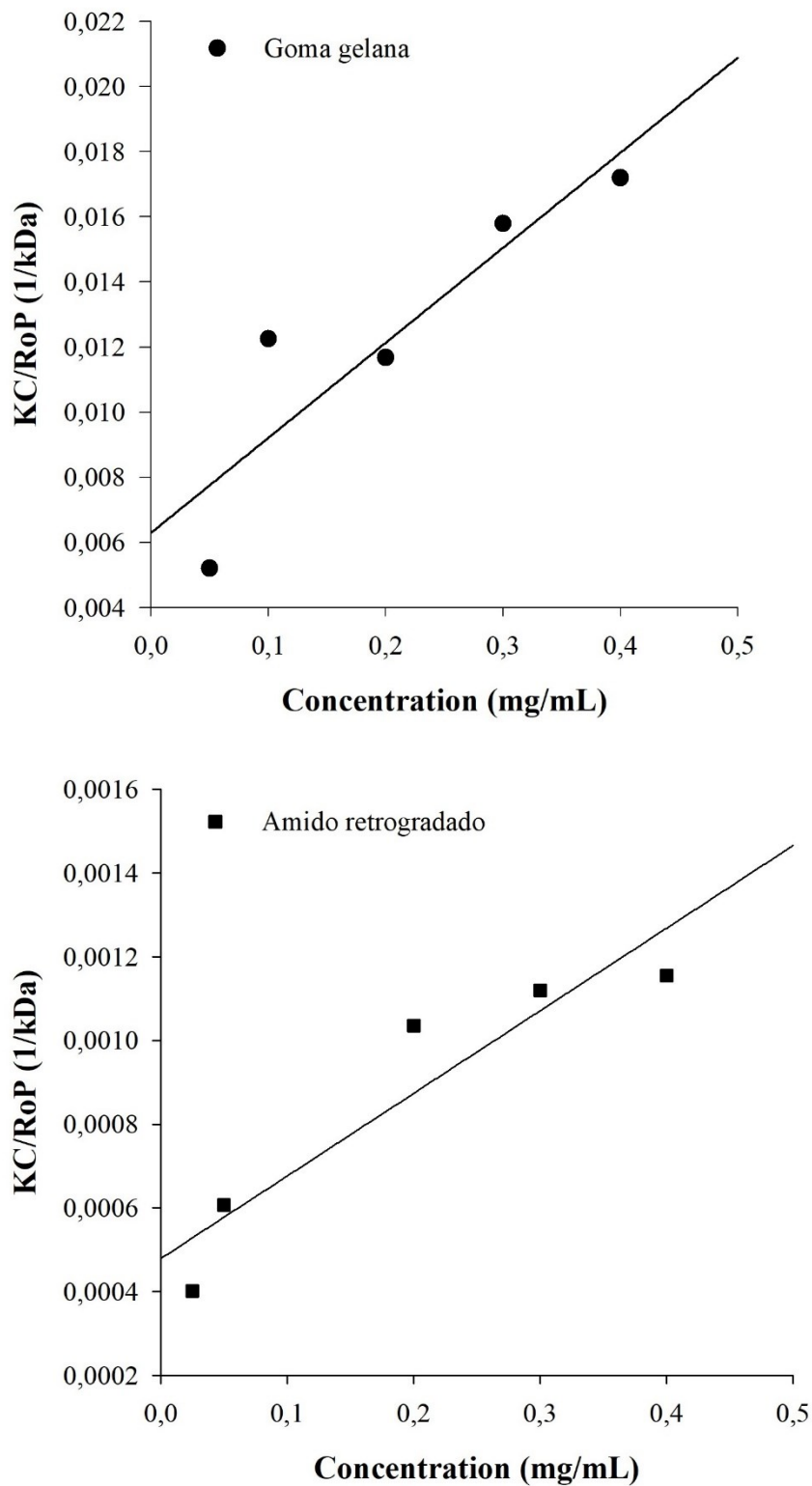


Figura 18. Gráfico de Debye apresentando a massa molar média dos polímeros.

A GG apresentou massa molar média de aproximadamente $158,25 \pm 42,68$ kDa ($r^2 = 0,89$), valor próximo àquele relatado pelo fabricante (200 – 300 kDa) (KELCOGEL:GELLAN GUM BOOK) e por Prezotti (2017), em estudos com nanopartículas a base de GG e pectina.

De acordo com o valor obtido, a GG pode ser considerada um polímero de elevada massa molar composta por unidades repetidas de α -L-ramnose, β -D-glicose e β -D-ácido glucurônico nas proporções 1:2:1 (ALVAREZ-LORENZO et al., 2013; OSMAŁEK et al., 2017). Vários estudos relatam que a massa molar média da GG varia entre 70 e 500 kDa e essa variação pode estar relacionada a fonte de extração e/ou processo de obtenção (MEHBOOB et al., 2015; MORRIS et al., 2012; PRAJAPATI et al., 2013).

O DMSO é um solvente bastante utilizado e capaz de solubilizar o amido sem causar degradação, como poderia acontecer com outros solventes (HAN; LIM, 2004). Assim, para avaliar a massa molar média do AR, uma mistura de água:DMSO (1:9) foi utilizada, pois segundo Han e Lim (2004) e Peng e Perlin (1987) essa mistura é capaz de aumentar a eficiência na solubilização do amido devido ao rompimento dos grânulos remanescentes.

A massa molecular média do AR foi de $1803 \pm 605,34$ kDa ($r^2 = 0,87$), 11 vezes maior que a massa molar média da GG. Segundo Trinh (2015) esse comportamento é característico de amidos que possuem elevado conteúdo de amilose (Hylon VII).

Polímeros de baixa massa molar contribuem para a formação de partículas menores, porém apresentam em sua estrutura cadeias poliméricas menores que degradam-se mais rapidamente. Em contrapartida, polímeros de alta massa molar dispõem de cadeias mais longas e flexíveis e apesar de formar partículas maiores, devido a maior viscosidade das dispersões, são capazes de diminuir o efeito *burst* e controlar as taxas de liberação do fármaco (GUPTA, 2016; HANS; LOWMAN, 2006; KUMARI et al., 2010). Oliveira e colaboradores (2011), em estudos com microesfera de acetobutirato de celulose contendo cetoprofeno, avaliou o efeito da massa molar desse polímero nas propriedades de liberação do fármaco, e concluíram que a elevada massa molar média do polímero reduziu o efeito *burst* e prolongou a liberação do cetoprofeno.

Polímeros de elevada massa molar são capazes de produzir uma dispersão fisicamente mais estável, em comparação aos polímeros de baixa massa molar (SEPASSI et al., 2007). Nesse sentido, os materiais estudados (GG e AR) podem ser considerados materiais promissores para produção de nanocarreadores para liberação controlada do BVZ.

Valores positivos de A_2 indicam uma maior interação entre polímero e solvente, sendo este apropriado para a solvatação das cadeias poliméricas. De modo oposto, se o A_2 possuir valor negativo a interação inter e intramolecular é elevada, podendo levar a agregação (MURPHY, 1997; RODEMBUSCH, 2001). Neste sentido, o valor de A_2 da GG e do AR foram positivos, $0,253 \pm 0,0043$ mL. Mol/g² e $0,0005 \pm 0,0004$ mL. Mol/g², respectivamente,

indicando que as interações entre polímeros e solventes são favoráveis, evitando a agregação e demonstrando que os solventes utilizados (água para GG e DMSO para o AR) foram adequados para solvatação das cadeias poliméricas.

5.2 Desenvolvimento das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas

5.2.1 Estudos para otimização das condições para obtenção das nanopartículas

5.2.1.1 Análise da influência do pH na formação dos sistemas

A complexação polieletrólítica ocorre pela associação entre polieletrólitos de cargas opostas em meio aquoso (polímero-polímero, polímero-fármaco e polímero-fármaco-polímero) através de interações intermoleculares, como ligação de hidrogênio, forças de Coulomb e de Van der Waals (BERGER; REIST; MAYER; FELT; PEPPAS; et al., 2004). Alguns parâmetros podem influenciar a formação das nanopartículas, como concentração do polieletrólito, força iônica, massa molar, pH do meio dispersante, distribuição e densidade de carga, tempo e temperatura de agitação (LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009).

A densidade de carga dos polímeros depende da capacidade de ionização desses materiais, sendo que essa propriedade pode ser influenciada pelo pH do meio dispersante. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi determinar o valor de PZ dos poliânions (GG e AR) e polication (BVZ) em função do pH do meio, para verificar em que região de pH os polieletrólitos exibiriam maior densidade de carga para favorecer a interação entre eles.

Inicialmente, a medida do PZ da solução aquosa do BVZ (1 mg/mL), obtida a partir da diluição comercial de BVZ (Avastin[®]), e a variação de pH (1,2 a 7,4) na solução de BVZ levou a instabilidade da proteína, que apresentou grandes variações de carga e formação de agregados, exibindo resultados inconsistentes. Assim, a medida do PZ do BVZ foi realizada somente no pH original da solução comercial de BVZ (Avastin[®]) (pH 6,2), e foi encontrado o valor de + 9 mV.

A Figura 19 mostra os valores de PZ das dispersões poliméricas em função do pH.

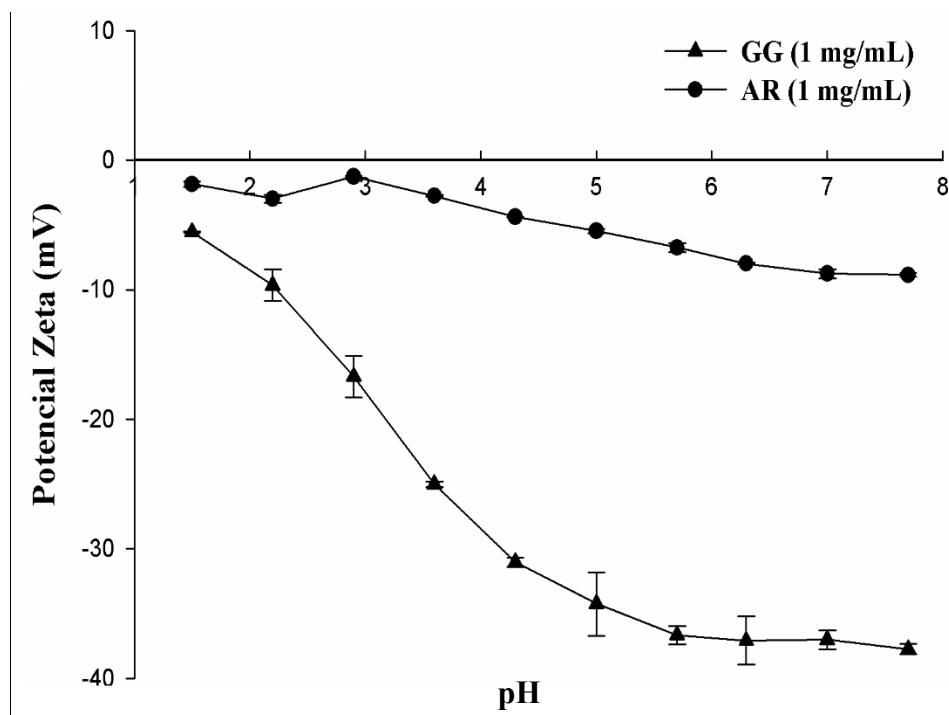


Figura 19. PZ (média e DP) das dispersões de GG e AR em função do pH.

A GG e o AR apresentaram-se negativamente carregados em toda faixa de pH estudado, provavelmente devido à ionização dos grupos carboxílicos (COOH) da GG e dos grupamentos hidroxilas (OH) do AR presentes nas estruturas poliméricas.

Entre o pH 1,5 e 4,8 houve um aumento significativo da carga negativa da GG, de -5 mV (pH 1,5) para aproximadamente -35 mV (pH 4,8). Entre pH 5,0 e 7,7 os valores de PZ permaneceram constantes (aproximadamente -37 mV). Em valores de pH mais elevados, acima do pH 6,0, que é superior ao pKa da GG (pKa=3,5), as cadeias poliméricas estão negativamente carregadas, em razão da ionização dos grupos carboxílicos (COOH) em ânions carboxilatos (COO⁻).

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com dados reportados na literatura para estudos com sistemas contendo GG (FASOLIN et al., 2013; PICONE; CUNHA, 2013; PREZOTTI, 2017; VILELA et al., 2015). A GG possui um pKa próximo a 3,5, determinado pela presença dos resíduos de ácido glucurônico. Em valores de pH acima de seu pKa, a densidade de carga negativa da GG aumenta devido à ionização dos grupos carboxílicos do ácido glucurônico (JONG; VAN DE VELDE, 2007; PICONE; CUNHA, 2013). Em valores reduzidos de pH (abaixo do seu pKa = 3,5), a ionização ocorre nos grupos carboxílicos laterais das moléculas da GG, reduzindo seu caráter aniônico. Os íons H⁺ se ligam à superfície das

hélices individuais da GG, o que diminui sua densidade de carga, reduzindo a mobilidade das cadeias, o que pode ainda favorecer a agregação (GIAVASIS et al., 2000; HORINAKA et al., 2004).

O AR apresentou valores de PZ próximo a -8 mV acima do pH 6,0, demonstrando que esse polímero também apresenta-se negativamente carregado em meio aquoso. Abaixo do pH 6,0, é possível verificar uma leve redução da densidade de carga. Esse comportamento deve-se ao fato de que a medida que o pH aumenta, os grupos hidroxilas (OH) do AR se desprotonam e a densidade de carga negativa aumenta, conforme relatado em estudos recentes (ROMDHANE et al., 2015; WEI et al., 2014).

Assim, os maiores valores de PZ dos polímeros apresentaram-se na faixa de pH 6 – 7,4 (Figura 19), indicando a maior densidade de carga nessa região é resultante da ionização dos grupos carboxílicos e hidroxilas dos polieletrólitos. Nessas condições, a interação entre as moléculas dos polímeros (através de ligações de hidrogênio) pode ter favorecido a formação das nanopartículas. Nesse sentido, os sistemas foram obtidos em meio aquoso, em pH 6,2, em que ambos polímeros e proteína apresentaram maior densidade de carga (BVZ +9 mV; AR -6 mV; GG -37 mV; GG/AR ~ -23 mV), devido ao maior número de grupamentos ionizáveis das cadeias poliméricas correspondentes no meio.

5.2.1.2 Análise da influência da proporção de polímero e fármaco no diâmetro médio hidrodinâmico, PDI e PZ das nanopartículas

O interesse no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados baseados em mistura de polissacarídeos, como GG e AR, fundamenta-se nas características particulares que esses materiais apresentam, como ampla biodisponibilidade e biocompatibilidade, atoxicidade e especialmente o baixo custo, além da capacidade mucoadesiva e de degradação seletiva pela microflora colônica. Tais propriedades contribuem para a vetorização do sistema para cólon e para a interação com a mucosa intestinal possibilitando a liberação sítio específica do fármaco, além de garantir a sua proteção contra a degradação enzimática nos segmentos superiores do TGI (FERRARI, 2005; GUPTE; CIFTCI, 2004; MA; COOMBES, 2014).

A interação entre os polieletrólitos ocorre principalmente através de atração eletrostática; entretanto, outros tipos de interações supramoleculares podem estar envolvidos no processo, como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (AHMADI et al., 2015; GUBBALA, 2012; INAMDER; MOURYA, 2010;

LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009; VASCONCELOS, 2007).

A formação e estabilidade das nanopartículas dependem de vários fatores, como o tipo dos polieletrólitos, seu grau de ionização, massa molar, concentração e proporção das misturas de polieletrólitos, distribuição de cargas ao longo das cadeias poliméricas, natureza e a posição dos grupos ionizados, flexibilidade das cadeias, temperatura, força iônica, pH do meio de reação, ordem de adição, razão e proporção das misturas poliméricas (DAKHARA; ANAJWALA, 2010; MEKA et al., 2017b).

O processo de formação das nanopartículas compreende três passos, sendo o primeiro relativo à formação dos complexos primários randômicos, que ocorre em um tempo relativamente curto, envolvendo o entrelaçamento entre as cadeias dos polímeros, especialmente através de ligações secundárias (forças de Coulomb), que se estabelecem mais rapidamente. O segundo passo envolve a formação de novas ligações (forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e hidrofóbicas), em que o sistema tende a sofrer uma adaptação conformacional, através do rearranjo das cadeias poliméricas em busca de condições termodinâmicas intracomplexos e maior estabilidade. No terceiro e último passo ocorre a interação intercomplexos, ou formação das nanopartículas propriamente ditos, que leva ao aumento do diâmetro médio da partícula (DAKHARA; ANAJWALA, 2010; INAMDER; MOURYA, 2010; LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009; MEKA et al., 2017a; SCHATZ et al., 2004).

Na fase preliminar ao desenvolvimento das nanopartículas, foi determinado a massa molar dos polímeros e o valor de pH 6,2 foi considerado mais adequado para formação das nanopartículas, uma vez que nesse pH os polímeros apresentaram a sua maior densidade de carga negativa (GG -37 mV e AR -8 mV) e o BVZ carga positiva (+9 mV). Assim, os sistemas foram obtidos pela técnica de complexação polieletrólítica e o diâmetro médio, o PDI, o PZ de todas as proporções estudadas foram analisados e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

O aspecto macroscópico dos sistemas formados foi avaliado para permitir a classificação visual das amostras, os quais foram adotadas as siglas *A* para agregado, *O* para dispersão opalescente e *L* para límpido (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito das diferentes proporções polímeros: fármaco nos valores de diâmetro médio, PDI e PZ das nanopartículas formadas.

Proporções (GG/AR:BVZ)	GG/AR (mg/mL)	BVZ (mg/mL)	Classificação Visual	PZ (mV)	Diâmetro médio (nm)	PDI
1:9	0,05	0,45	O	-15,07	296,97	0,13
2:8	0,1	0,4	O	-15,73	262,13	0,08
3:7	0,15	0,35	O	-21,77	220,00	0,19
4:6	0,2	0,3	O	-20,67	199,03	0,24
5:5	0,25	0,25	O	-24,37	191,70	0,26
6:4	0,3	0,2	O	-20,20	194,07	0,26
7:3	0,35	0,15	O	-24,77	209,97	0,35
8:2	0,4	0,1	O	-17,87	404,80	0,75
9:1	0,45	0,05	A	-7,86	589,13	0,91

Verificou-se que a formação das nanopartículas ocorreu de forma espontânea, após a adição do BVZ (polication) à mistura polimérica (polianions), visualizada pelo efeito de turvação do meio. A associação entre polímeros e proteína nas diferentes proporções resultou na alteração dos valores de PZ (Tabela 4) em relação aos materiais isolados (BVZ + 9mV; GG -37 mV e AR -9 mV), indicando a ocorrência da interação eletrostática entre os eles.

Em valores de pH mais elevados (acima de pH 3,5), os polímeros encontram-se carregados negativamente, devido a ionização dos grupamentos carboxílicos da GG e hidroxila do AR. Assim, é possível sugerir que durante a formação das nanopartículas, em pH 6,2, os grupamentos ionizados das cadeias poliméricas conferiram uma maior densidade de carga aos materiais (PZ da GG = - 37 mV; PZ do AR = - 8 mV), e à medida em que o BVZ (PZ = + 9 mV) foi adicionado à dispersão polimérica, a carga positiva dos grupos amins laterais, principalmente dos aminoácidos arginina e lisina da proteína em ambiente aquoso favoreceu a interação eletrostática com os grupamentos ionizados da mistura polimérica GG/AR (PZ = ~ - 23 mV) (Figura 20).

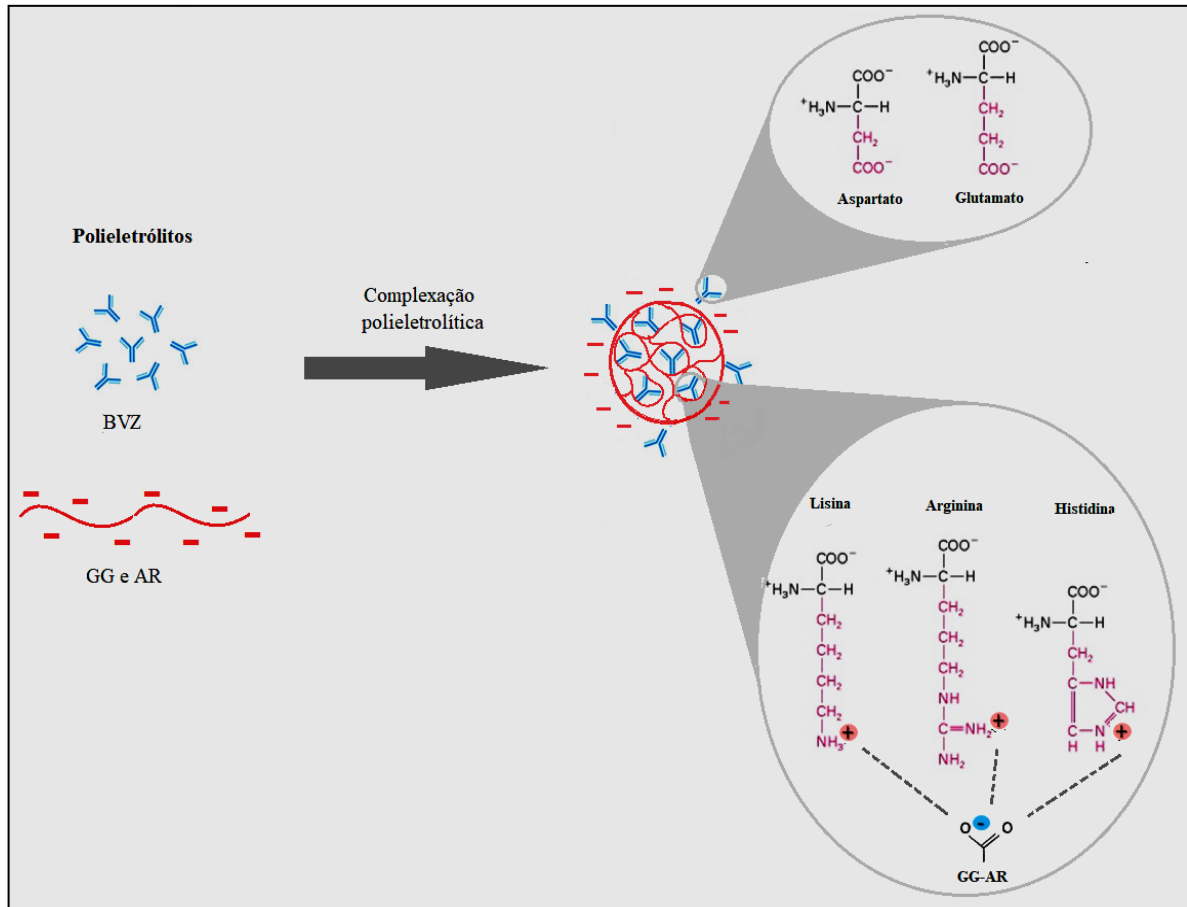


Figura 20. Representação esquemática da formação das nanopartículas.
Fonte: Autoria própria.

Além de aminoácidos hidrofóbicos, as proteínas possuem aminoácidos hidrofílicos responsáveis pela solubilidade da macromolécula em água. Os três principais aminoácidos hidrofílicos, arginina, lisina, histidina e o ácido aspártico e glutâmico, são responsáveis pela densidade de carga superficial positiva da proteína, pois de acordo com os pKas dos aminoácidos das cadeias laterais arginina (pKa = 12,5) e lisina (pKa = 10,8), em pH 6,2 estes estão carregados positivamente, enquanto o ácido aspártico (pKa = 3,86) e o ácido glutâmico (pKa = 4,25) em valores acima do seu pKa tornam-se carregados negativamente (aspartato e glutamato) (LODISH et al., 2000).

De acordo com dados da Tabela 4 e Figura 21, as nanopartículas apresentaram diâmetro médio variando entre 191,70 nm – 589,13 nm, sendo que as proporções 8:2 e 9:1 (polímeros:BVZ), exibiram os maiores valores de diâmetro médio, 404,80 nm e 589,13 nm, respectivamente ($p < 0,05$).

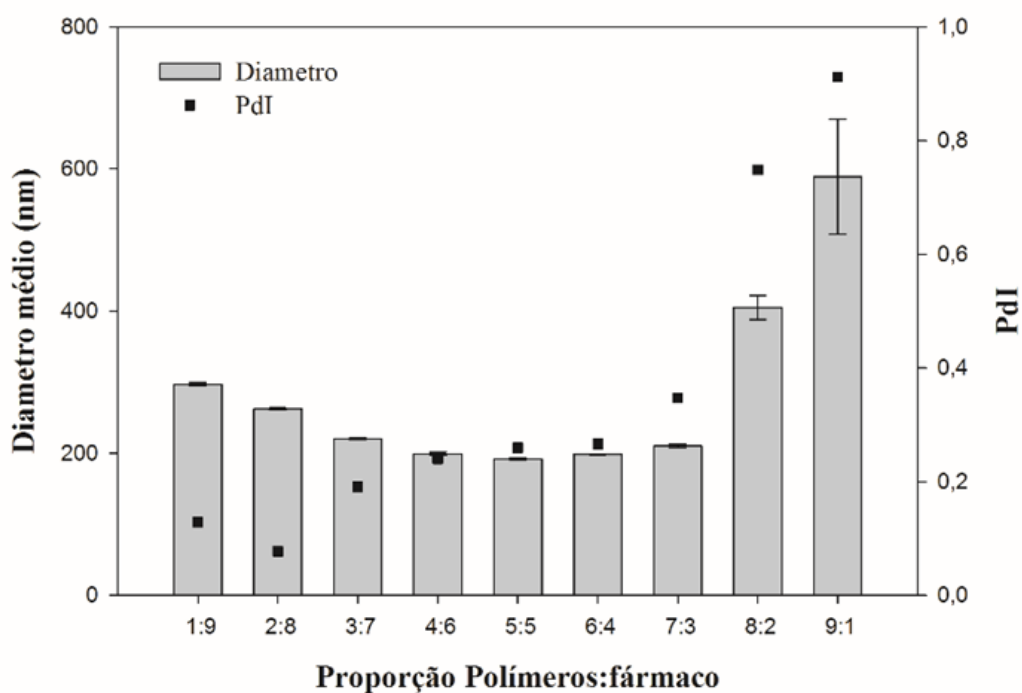


Figura 21. Diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas (n=3).

Para as amostras que apresentaram perfil de distribuição de tamanho homogênea e unimodal (com $PDI < 0,3$) foi considerado a média do diâmetro hidrodinâmico (*Z-average*). As demais amostras (proporções 7:3, 8:2 e 9:1), consideradas polidispersas ($PDI > 0,3$), os valores de tamanho de partícula referem-se ao tamanho médio da maioria das partículas, representado pelo pico de maior área no gráfico de intensidade (Figura 22), uma vez que a distribuição de tamanho destas amostras foi bastante heterogênea e multimodal.

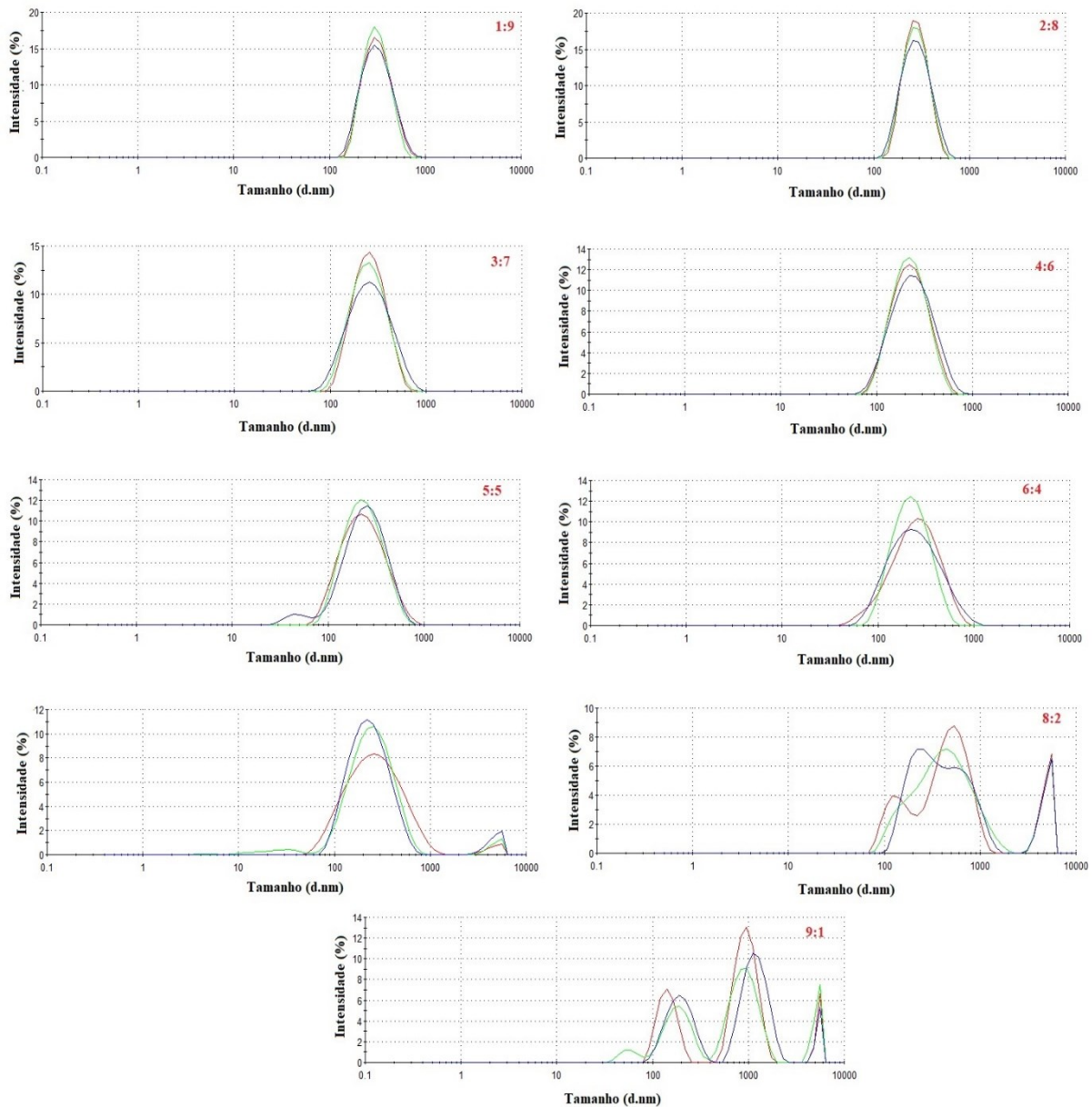


Figura 22. Gráfico de distribuição de tamanho por intensidade de espalhamento de luz das proporções estudadas

Em relação ao PDI, o menor valor de PDI foi verificado para proporção 2:8 (PDI=0,08) ($p < 0,05$), indicando a quase monodispersidade dessa amostra, enquanto as proporções 8:2 e 9:1 (Figura 22) apresentaram os maiores valores de PDI (0,75 e 0,91, respectivamente), sendo consideradas muito polidispersas. As demais amostras exibiram valores de PDI entre 0,1 – 0,35, indicando uma menor polidispersidade. Assim, essas amostras não poderiam ser consideradas monodispersas, pois de acordo com Gaumet e colaboradores (2008) e Avadi e colaboradores (2010), a monodispersidade está relacionada a valores de $PDI \leq 0,1$ e quando os valores de PDI estão acima de 0,5 são consideradas de média polidispersidade (CHO et al., 2013; SHARMA et al., 2014).

O PZ é um parâmetro extremamente importante relacionado à densidade de carga superficial das partículas. Neste estudo, os valores de PZ de todas as amostras foram negativos (Figura 23), sendo que as proporções 3:7, 5:5 e 7:3, exibiram os maiores valores (em módulo), -21,77 mV, -24,37 mV e -24,77 mV, respectivamente (Tabela 4; Figura 23) ($p < 0,05$). Provavelmente, a carga residual negativa das nanopartículas é resultante da grande quantidade de grupamentos negativamente carregados presentes nas cadeias dos polímeros, que possuem elevada massa molar.

A densidade de carga negativa das nanopartículas é um atributo favorável a estabilidade física dos sistemas. De acordo com Parveen e Sahoo (2010) valores elevados de PZ indicam elevado grau de ionização e, conseqüentemente, maior repulsão eletrostática entre as partículas, e sob tais condições a agregação pode ser reduzida, melhorando a estabilidade elétrica dos sistemas.

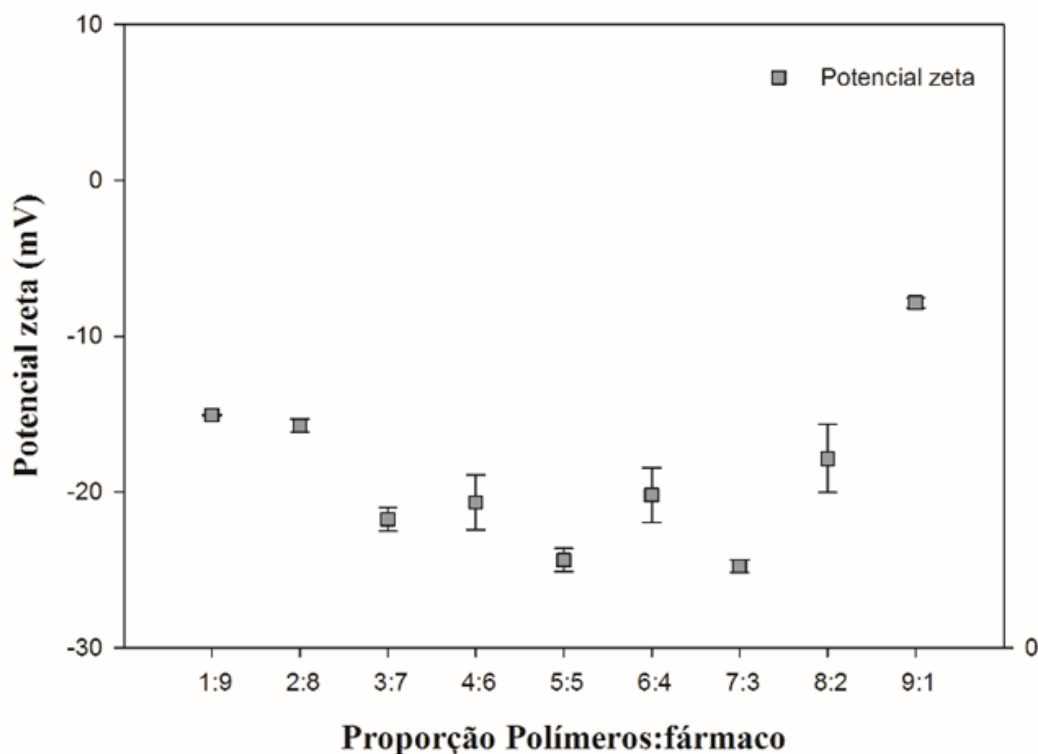


Figura 23. Potencial zeta das nanopartículas.

Na proporção 9:1 foi verificado o menor PZ, atribuído a menor quantidade de cargas negativas dos polímeros. Nesse caso, a reduzida densidade de carga diminuiu a repulsão eletrostática, favorecendo a aglomeração intermolecular, o que explica o maior tamanho desse

NP.

Assim, com base nas características físico-químicas de diâmetro médio, PDI e PZ, pode-se observar que em todas as proporções foram obtidas partículas de dimensões nanométricas, e as proporções 3:7, 5:5 e 7:3 foram selecionadas como as mais promissoras para a continuidade dos estudos, já que os valores de PZ próximos a -23,64 mV e PDI abaixo de 0,5 foram considerados atributos favoráveis para a obtenção das nanopartículas com maior homogeneidade de tamanho e estabilidade física do sistema.

5.2.2 Preparo das nanopartículas reticuladas utilizando planejamento fatorial completo 3^3

Nanopartículas são consideradas sistemas termodinamicamente instáveis e tendem a agregação e crescimento naturalmente. Um dos grandes desafios da nanotecnologia é desenvolver sistemas que sejam capazes de se manter estáveis por longos períodos de tempo, sem sofrer alterações estruturais ou variações de suas propriedades físico-químicas (TÜRKOĞLU; TAŞCI OĞLU, 2014).

A reticulação iônica pode ser utilizada para construção de estruturas mais fortes, possibilitando a formação de um material fisicamente mais estável e com propriedades adequadas para atender às necessidades terapêuticas específicas. O fortalecimento da rede estrutural de sistemas nanométricos utilizando a reticulação iônica representa uma estratégia racional, uma vez que a obtenção dos sistemas ocorre em condições amenas, evitando o uso de solventes orgânicos ou elevadas temperaturas, e possibilitando a incorporação de fármacos, células, enzimas (YEO; BAEK; PARK, 2001) e proteínas (MA; LIU, 2010).

Para obtenção das nanopartículas reticuladas, utilizou-se a reticulação com $AlCl_3$, uma vez que a trivalência do íon Al^{3+} permite estabelecer ligações com mais de um ânions carboxilatos dos polímeros, podendo resultar em uma malha mais rígida e estável, contribuindo para o aprisionamento mais efetivo do fármaco na matriz reticulada (BONI et al., 2016; MENEGUIN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; DE SOUZA E SILVA; et al., 2018; PREZOTTI, 2017; PREZOTTI et al., 2014).

Assim, estudos preliminares sobre o efeito da concentração de $AlCl_3$ na formação dos complexos evidenciaram que concentrações acima de 0,025 mg/mL resultaram na formação de partículas micrométricas e/ou agregados. Com base nos dados obtidos, foram selecionadas três concentrações, 0,015 mg/mL, 0,02 mg/mL e 0,025 mg/mL de $AlCl_3$, as quais correspondem a

4%, 6% e 7%, respectivamente, em relação a massa total de polímeros. Em seguida foi realizado o planejamento fatorial (PF) do tipo completo 3^3 , utilizando-se o *software* livre *Gui Octave v. 1.0.14*, para avaliar a influência das concentrações de fármaco, polímeros e $AlCl_3$ na formação das nanopartículas reticuladas.

O desenvolvimento das nanopartículas reticuladas utilizando-se o PF baseia-se na possibilidade de explorar de maneira mais efetiva a influência das variáveis, ou da interação entre elas, sobre os resultados obtidos, através de um número reduzido de experimentos. Além disso, o PF permite que os experimentos sejam realizados de forma racional, evitando gastos excessivos de materiais e tempo, o que na maioria das vezes não ocorre quando se escolhe realizar os experimentos através de tentativas e erros (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

O PF é descrito como x^k , onde x representa o número de variáveis independentes (fatores) e k os níveis em que estas são estudadas (BARROS NETO; et al., 2010). Assim, no PF 3^3 , totalizando 27 experimentos, foram estudados três fatores independentes ($x=3$) em três níveis diferentes ($k=3$), alto, médio e baixo, codificados como +1, 0 e -1, respectivamente.

Após definir os fatores (concentrações de fármaco, polímeros e $AlCl_3$) e as respostas (variáveis dependentes) (diâmetro médio hidrodinâmico, PDI e PZ), todos os ensaios foram realizados aleatoriamente e listados em uma matriz de planejamento, especificando todas as possíveis combinações entre os níveis e os fatores escolhidos (Tabela 5). A matriz dos fatores com os valores codificados (+1, 0, -1) representa a matriz x e as respostas obtidas para cada experimento formam a matriz y . Ambas matrizes foram utilizadas como parâmetros de entrada (*inputs*) para o *software* *Gui Octave v. 1.0.14*, utilizado no delineamento e análise do PF.

Tabela 5. Fatores ou variáveis independentes, com seus valores codificados, e as respostas aplicadas no PF completo 3³.

Amostras	Fatores ou variáveis independentes						Respostas		
	Composição das amostras (mg/mL)			Valores codificados			Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	PdI	PZ (mV)
GG/AR	BVZ	AlCl ₃	GG/AR	BVZ	AlCl ₃				
1	0,15	0,15	0,015	-1	-1	-1	266,83	0,37	-21,30
2	0,15	0,25	0,015	-1	0	-1	206,07	0,22	-20,23
3	0,15	0,35	0,015	-1	1	-1	273,57	0,13	-14,37
4	0,25	0,15	0,015	0	-1	-1	292,70	0,41	-22,20
5	0,25	0,25	0,015	0	0	-1	226,77	0,26	-20,10
6	0,25	0,35	0,015	0	1	-1	236,93	0,23	-18,80
7	0,35	0,15	0,015	1	-1	-1	347,10	0,43	-24,07
8	0,35	0,25	0,015	1	0	-1	265,70	0,29	-24,20
9	0,35	0,35	0,015	1	1	-1	268,57	0,26	-24,87
10	0,15	0,15	0,02	-1	-1	0	660,90	0,63	-27,17
11	0,15	0,25	0,02	-1	0	0	3420,33	0,54	-22,53
12	0,15	0,35	0,02	-1	1	0	3251,67	0,28	-20,27
13	0,25	0,15	0,02	0	-1	0	493,03	0,38	-24,50
14	0,25	0,25	0,02	0	0	0	936,40	0,68	-28,10
15	0,25	0,25	0,02	0	1	0	646,40	0,78	-28,20
16	0,25	0,25	0,02	1	-1	0	629,87	0,89	-29,70
17	0,25	0,35	0,02	1	0	0	508,33	0,50	-22,93
18	0,35	0,15	0,02	1	1	0	416,67	0,51	-24,93
19	0,35	0,25	0,02	-1	-1	1	5284,00	0,41	-30,47
20	0,35	0,35	0,02	-1	0	1	5845,00	0,28	-25,43
21	0,15	0,15	0,025	-1	1	1	5275,67	1,00	-16,30
22	0,15	0,25	0,025	0	-1	1	450,30	0,45	-13,37
23	0,15	0,35	0,025	0	0	1	550,10	0,15	-10,44
24	0,25	0,15	0,025	0	1	1	572,30	0,60	-16,40
25	0,25	0,25	0,025	1	-1	1	581,70	0,59	-19,57
26	0,25	0,35	0,025	1	0	1	550,47	0,43	-18,17
27	0,35	0,15	0,025	1	1	1	567,67	0,52	-20,49

Os efeitos dos fatores analisados sobre as respostas obtidas foram os efeitos principais (variação dos fatores isoladamente), os efeitos quadráticos (fatores nas máximas concentrações) e os efeitos de interação (efeito combinado de dois ou mais fatores) (Tabela 6).

Tabela 6. Efeitos principais, quadráticos e de interação das variáveis analisadas no PF completo 3³

Variáveis analisadas	
	v1 (concentração de GG/AR)
Efeitos principais	v2 (concentração de BVZ)
	v3 (concentração de AlCl ₃)
Efeitos quadráticos	v1 ² (máxima concentração GG/AR)
	v2 ² (máxima concentração de BVZ)
	v3 ² (máxima concentração de AlCl ₃)
Efeitos de interação	v12 (concentração de GG/AR x concentração de BVZ)
	v13 (concentração de GG/AR x concentração de AlCl ₃)
	v23 (concentração de BVZ x concentração de AlCl ₃)
	v123 (concentração de GG/AR x concentração de BVZ x concentração de AlCl ₃)

A análise de variância demonstrou que os efeitos principais v1 (concentração de polímeros) e v3 (concentração de AlCl₃), o efeito quadrático v3² (máxima concentração de AlCl₃) e de interação v1-v3 (interação polímeros-AlCl₃) foram estatisticamente significativos em relação ao diâmetro médio das nanopartículas reticuladas ($p < 0,05$). Esses comportamentos estão apresentados nos gráficos de superfície e resposta (Figura 24).

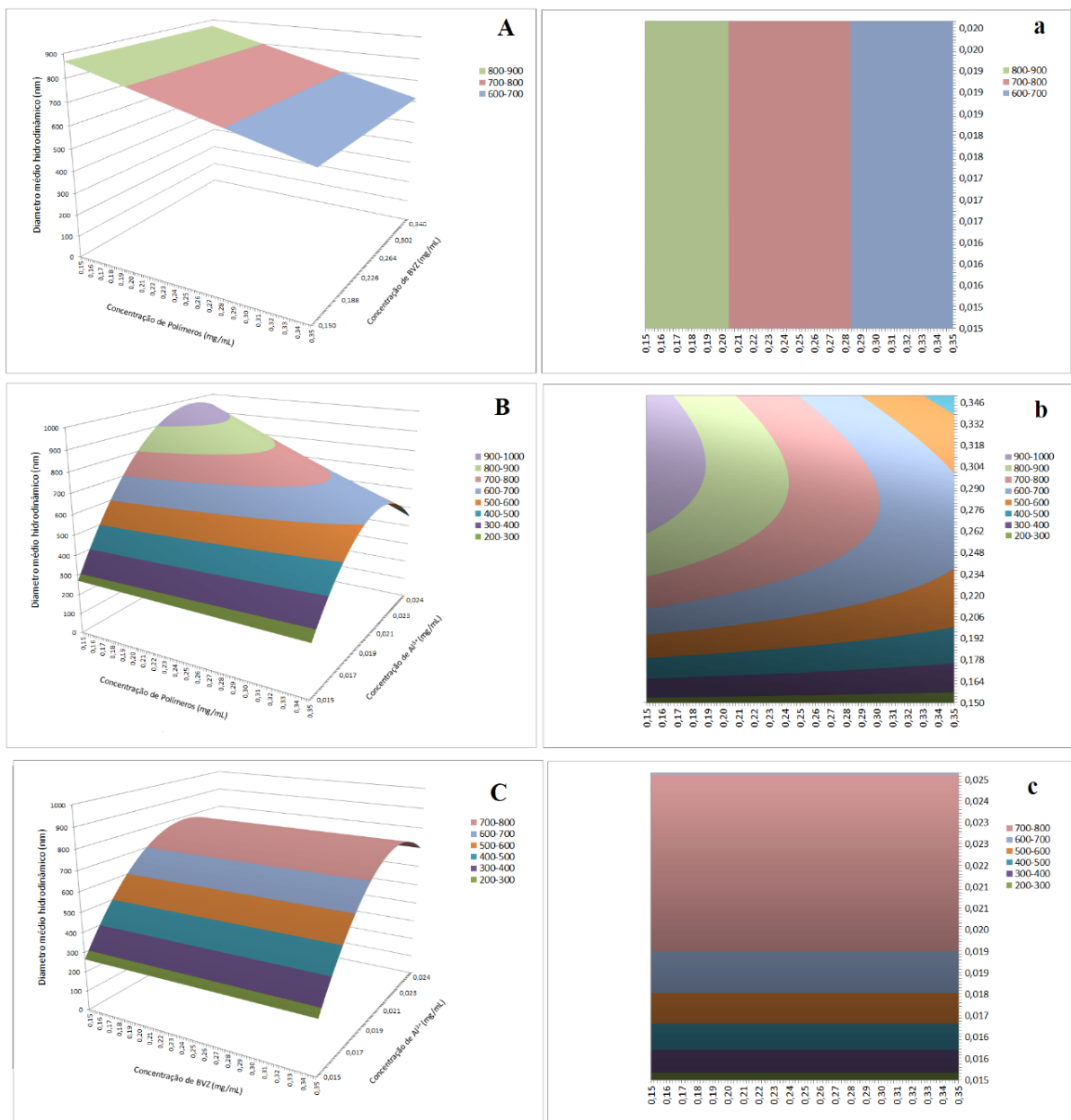


Figura 24. Gráfico de superfície de resposta (A, B e C) e de contorno (a, b e c) dos efeitos das concentrações de polímeros, fármaco e $AlCl_3$ no diâmetro médio das nanopartículas reticuladas.

Os resultados revelaram que, independente da concentração de BVZ, o menor diâmetro médio foi exibido nas máximas concentrações de polímeros (0,35 mg/mL) (Figura 24 A e a) (área azul) e mínimas de $AlCl_3$ (0,015 mg/mL) (Figura 24 B e b) (área verde) ($p < 0,05$). Esse comportamento pode estar relacionado à maior concentração de polímeros que deve ter assumido uma conformação mais enovelada interagindo fortemente com o BVZ levando a formação de uma estrutura mais compacta. Além disso, acredita-se que, mesmo em menor concentração, o agente reticulante pode ter favorecido a formação de estruturas muito

compactadas e, conseqüentemente, partículas de tamanho mais reduzido.

De modo geral, a concentração de fármaco não influenciou de maneira significativa no diâmetro médio das partículas ($p < 0,05$) (Figura 24 A, a; Figura 24 C, c).

Para o Pdl, a análise de variância demonstrou que somente os efeitos principais v2 (concentração de BVZ) e v3 (concentração de $AlCl_3$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Tal comportamento pode ser observado nos gráficos de superfície e resposta da Figura 25.

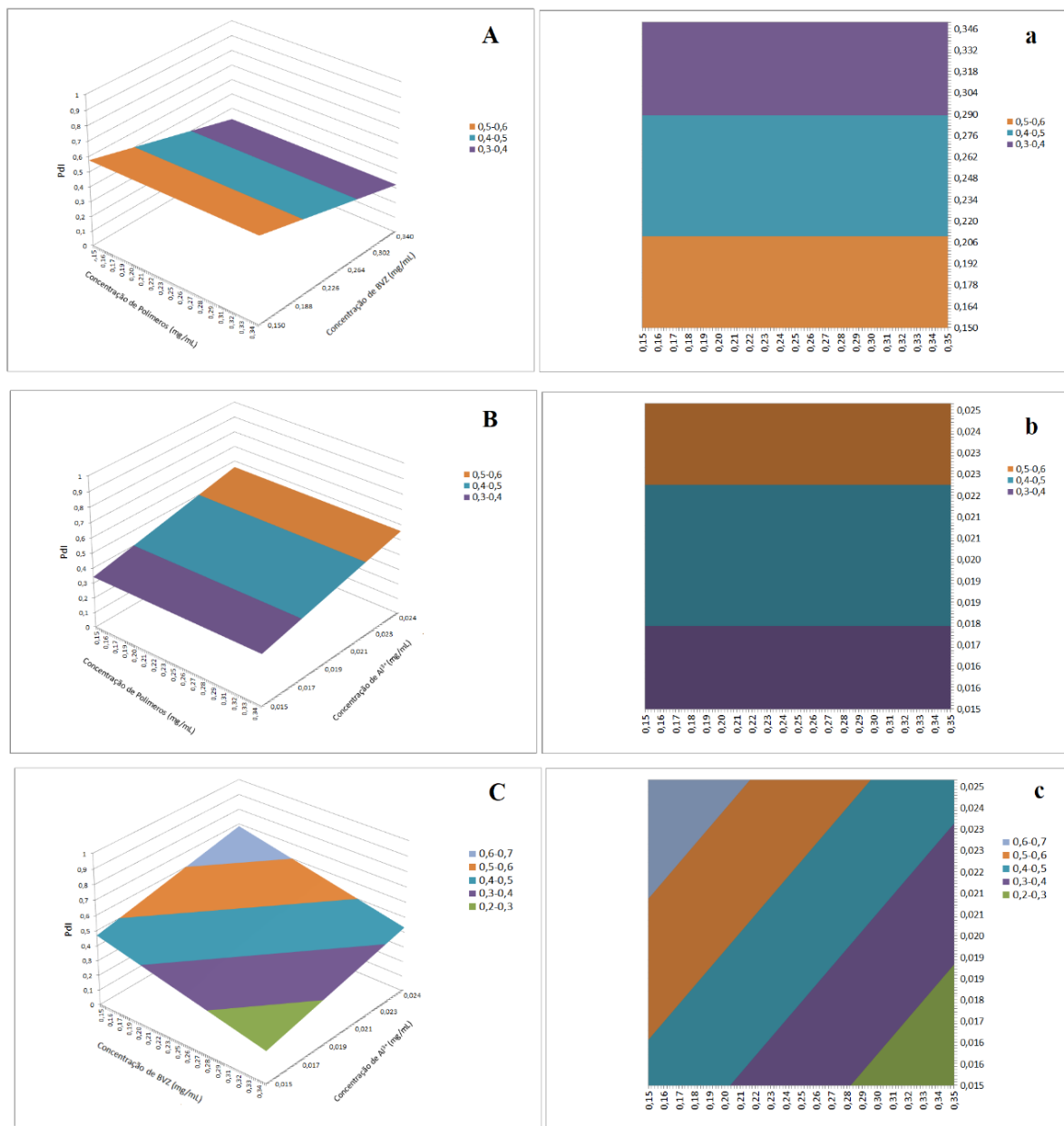


Figura 25: Gráfico de superfície de resposta (A, B e C) e de contorno (a, b e c) dos feitos das concentrações de polímeros, fármaco e $AlCl_3$ no PdI.

Os resultados mostraram que a variação na concentração de polímeros (v_1) não influenciou de maneira significativa os valores de PdI ($p > 0,05$) (Figura 25 A, a; Figura 25 B e b). Por outro lado, foi observado que a maior concentração de BVZ (0,35 mg/mL) e menor concentração de $AlCl_3$ (0,015 mg/ml) levaram a menores valores de PdI (entre 0,1 – 0,35) ($p < 0,05$). Esse comportamento está representado pela área roxa na Figura 25 A, a e na Figura 25 C, c e pela área verde na Figura 25 C, c, e indica uma maior homogeneidade de tamanho dessas amostras. Segundo Avadi e colaboradores (2010), valores de PdI abaixo de 0,5 indicam homogeneidade de tamanho (CLAYTON et al., 2016; GAUMET et al., 2008). Assim, as

nanopartículas reticuladas que apresentaram valores entre 0,1 – 0,35 são consideradas polidispersas; entretanto, apresentam homogeneidade de tamanho, que pode ser um atributo favorável para a estabilidade física.

Para o PZ, a partir da análise de variância, verificou-se que os efeitos que influenciaram de maneira significativa nos resultados foram o efeito principal v1 (concentração de polímeros), o efeito quadrático v3² (máxima concentração de AlCl₃) e o efeito de interação v1-v2 (interação polímero-BVZ) ($p < 0,05$). Esses comportamentos estão ilustrados nos gráficos de superfície e resposta na Figura 26.

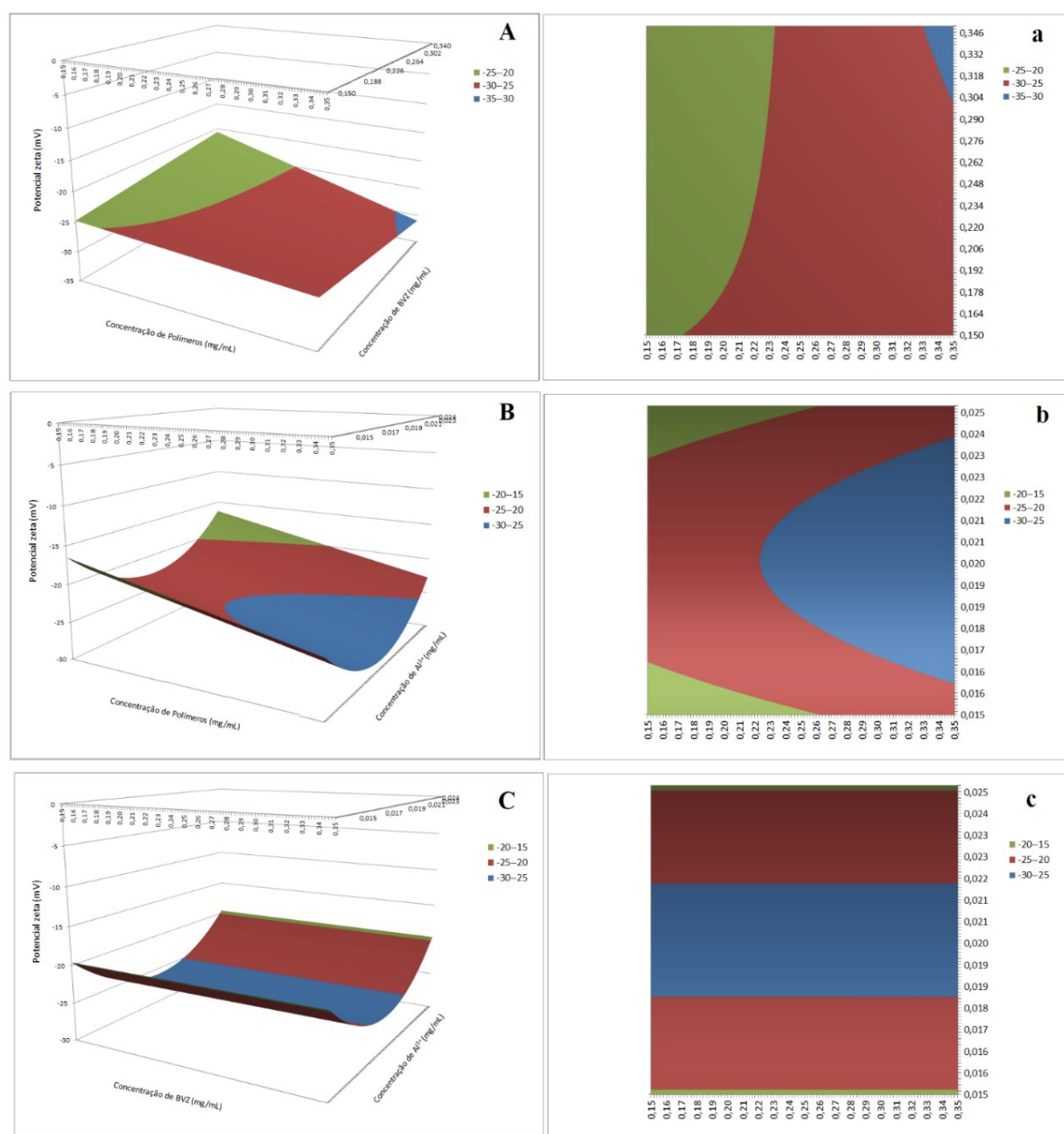


Figura 26: Gráfico de superfície de resposta (A, B e C) e de contorno (a, b e c) dos efeitos das concentrações e polímeros, fármaco e AlCl₃ no PZ.

De maneira geral, a Figura 26 mostra que a maior concentração de polímeros (0,35 mg/mL) e de BVZ (0,35 mg/mL) (Figura 26 A e a) (área azul) resultou em elevados valores de PZ (aproximadamente - 31 mV) ($p < 0,05$). O mesmo comportamento foi verificado na concentração intermediária de AlCl₃ (0,02 mg/mL) (Figura 26 B e b; Figura 26 C e c) (área azul), onde os valores de PZ apresentaram-se em torno de -30 mV. Considerando a elevada massa molar média (GG com ~160 kDa e AR com ~1803 kDa), em relação ao BVZ (149 kDa), esse comportamento pode ser atribuído à maior densidade de carga negativa proveniente da

maior quantidade de ânions carboxilatos e hidroxilas presentes nas cadeias poliméricas, em excesso.

O conjunto dos resultados permitiu concluir que as condições mais favoráveis para obtenção das nanopartículas reticuladas foram máxima concentração de polímero (0,35 mg/mL), independente da concentração de BVZ e mínima (0,015 mg/mL) e intermediária (0,02 mg/mL) concentração de $AlCl_3$. Nessas condições os nanopartículas reticuladas obtidos apresentaram diâmetro médio de dimensões nanométricas (< 700 nm), com baixa polidispersidade ($PDI < 0,5$) e PZ negativo (em torno de $- 20$ mV). Assim, para a continuidade do estudo, as nanopartículas reticuladas selecionadas a partir do PF completo 3³ (Tabela 7) e as respectivas nanopartículas serão caracterizadas e a análise comparativa entre os resultados obtidos para as nanopartículas não reticuladas e reticuladas será realizada a fim de verificar a influência do processo de reticulação nas propriedades físico-químicas dos sistemas.

A denominação e composição das amostras estão sumarizadas na Tabela 7, sendo que para as amostras reticuladas foram adicionados os sufixos R1 e R2, quando reticuladas com 0,015 mg/mL e 0,02 mg/mL de $AlCl_3$, respectivamente.

Tabela 7. Composição e nomenclatura das nanopartículas e das nanopartículas reticuladas selecionados com o PF completo 3³.

Amostras	Polímeros GG/AR(1:1) (mg/mL)	BVZ (mg/mL)	$AlCl_3$ (mg/mL)
NP1	0,35	0,15	-
NP1R1	0,35	0,15	0,015
NP1R2	0,35	0,15	0,020
NP2	0,35	0,25	-
NP2R1	0,35	0,25	0,015
NP2R2	0,35	0,25	0,020
NP3	0,35	0,35	-
NP3R1	0,35	0,35	0,015
NP3R2	0,35	0,35	0,020

5.3 Caracterização físico-química das nanopartículas reticuladas e não reticuladas

5.3.1 Análise de tamanho, PDI e potencial zeta

Um dos desafios no desenvolvimento de sistemas nanestruturados consiste em obter um sistema fisicamente estável e com potencial para interação biológica (KUMARI et al., 2010). Neste sentido, a modulação de características como tamanho da partícula e PZ pode favorecer as interações na nano-biointerface (NEL et al., 2009).

As amostras selecionadas pelo PF foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio hidrodinâmico, Pdl e PZ e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Diâmetro médio hidrodinâmico (nm), Pdl e PZ das nanopartículas reticuladas e não reticuladas (em pH 6,2), selecionadas com PF completo 3³.

Amostras	Diâmetro médio		
	hidrodinâmico (nm)	Pdl	PZ (mV)
NP1	260,08 ± 76,59	0,26 ± 0,04	-22,79 ± 0,63
NP1R1	347,10 ± 5,30	0,43 ± 0,01	-24,07 ± 0,91
NP1R2	629,87 ± 27,57	0,51 ± 0,06	-20,33 ± 1,19
NP2	299,57 ± 33,51	0,39 ± 0,09	-30,50 ± 1,19
NP2R1	265,70 ± 3,22	0,29 ± 0,01	-24,20 ± 0,87
NP2R2	508,33 ± 3,79	0,41 ± 0,04	-23,40 ± 0,92
NP3	276,61 ± 70,53	0,18 ± 0,06	-23,39 ± 2,51
NP3R1	268,57 ± 1,08	0,26 ± 0,00	-24,87 ± 1,07
NP3R2	416,67 ± 12,72	0,28 ± 0,01	-23,90 ± 0,52

De maneira geral, as nanopartículas formadas apresentaram diâmetro médio na faixa de 260,08 ± 76,59 nm – 629,87 ± 27,57 nm (Tabela 8).

Os menores valores de diâmetro foram verificados para as nanopartículas não reticuladas ($p < 0,05$) (Figura 27 A), o qual deve ser atribuído a forte interação entre fármaco-polímeros que favoreceu a formação de uma estrutura mais compactada. Entre essas amostras não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 8).

Nesse caso, pode-se concluir que a concentração do BVZ não influenciou no diâmetro médio das nanopartículas não-reticuladas ($p > 0,05$).

Entre as nanopartículas reticuladas os maiores valores de diâmetro foram exibidos pelas amostras com maior concentração de reticulante (0,02 mg/mL) (R2) (NP1R2, NP2R2 e NP3R2) (Figura 27 A), sendo o maior valor (629,87 ± 27,57 nm) (Tabela 8) exibido pela amostra

NP1R2. Provavelmente, a elevada concentração de agente reticulante deve favorecer o aprisionamento de maior quantidade de moléculas do fármaco no interior da matriz, levando a formação de uma rede mais expandida e rígida, consequentemente, partículas com diâmetro maiores. Esse resultado corrobora os dados de EI%, em que verificou-se que na máxima concentração de agente reticulante maior quantidade de fármaco foi encapsulado (Tabela 17).

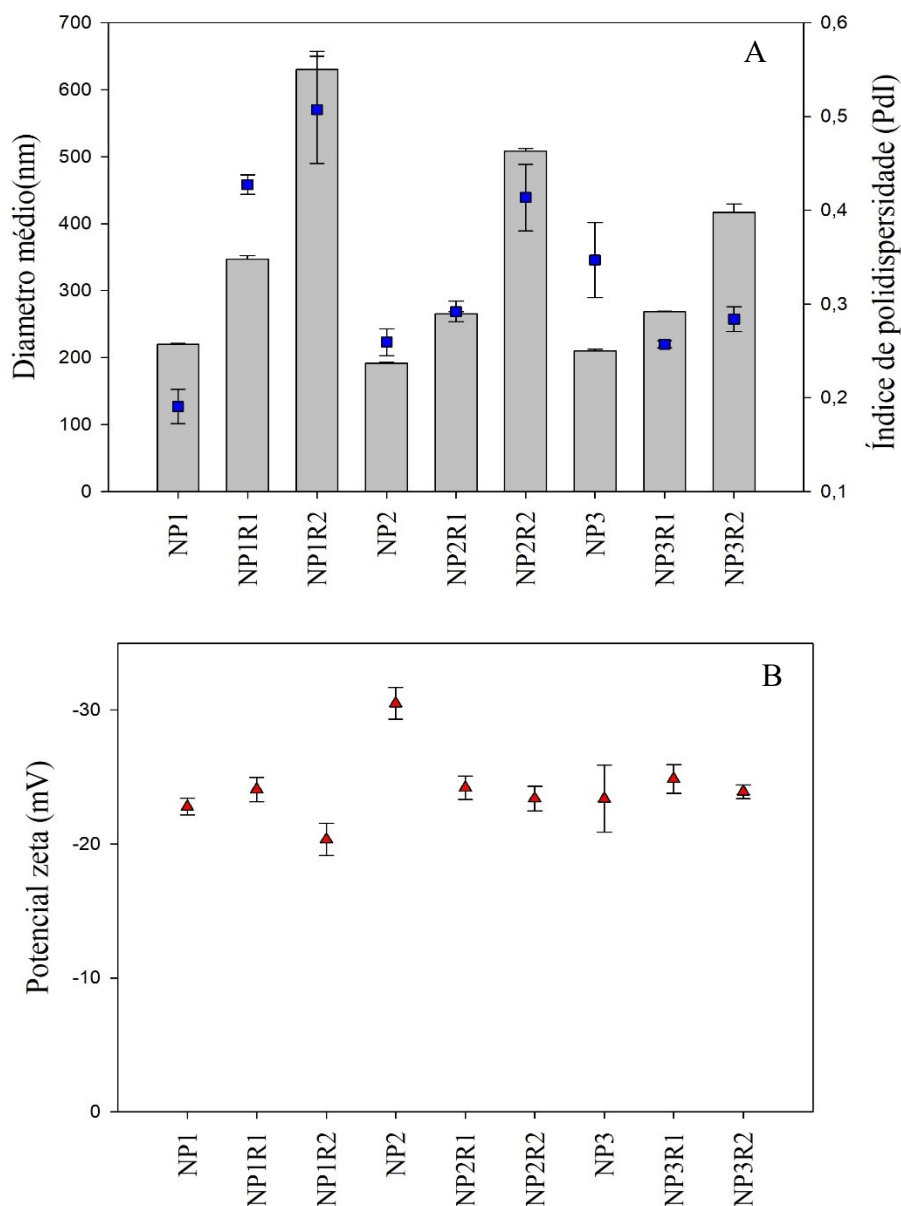


Figura 27. Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão, representado pelas barras e pontos, respectivamente (A); e potencial zeta (B) de todas as nanopartículas reticuladas e não reticuladas.

Entre as amostras reticuladas com 0,015 mg/mL de AlCl_3 (R1) não houve diferenças estatisticamente significativas para o diâmetro ($p > 0,05$).

Os valores de PDI entre todas as amostras estudadas variou entre 0,18 - 0,51, demonstrando uma distribuição do tamanho mais homogênea (AVADI et al., 2010; GAUMET et al., 2008), sendo que os maiores valores de PDI foram exibidos pelas amostras NP2, NP1R1, NP1R2 e NP2R2 ($p < 0,05$), indicando a polidispersidade dessas amostras (Figura 27 A).

No caso do PZ, de maneira geral, o caráter aniônico das nanopartículas foi evidenciado pelos valores de PZ maiores que -20 mV (Tabela 8) (Figura 27 B), o que representa um atributo favorável que pode contribuir para estabilidade física e elétrica dos sistemas e as interações com as superfícies biológicas, como por exemplo, o muco intestinal.

Entre as nanopartículas não reticuladas, nenhuma diferença estatística foi verificada entre NP1 e NP3; entretanto, NP2 foi a que exibiu o maior valor de PZ ($-30,50 \pm 1,19$ mV) ($p < 0,05$), o que pode ser devido à menor quantidade de moléculas do fármaco para interagir com os grupamentos carboxílicos e hidroxilas dos polímeros, que em excesso resultaram no elevado valor de PZ.

Para as nanopartículas reticuladas não houve diferença estatisticamente significativa para o PZ ($p > 0,05$), exceto para NP1R2 que apresentou o menor valor de PZ ($-20,33 \pm 1,19$ mV) (Tabela 8) (Figura 27 B). Provavelmente, a maior concentração de $AlCl_3$ dessa amostra deve ter favorecido a interação fármaco-polímero, reduzindo a quantidade de grupos carboxílicos e hidroxilas ionizados disponíveis, reduzindo a densidade de carga superficial.

O conjunto de dados revelou que, de maneira geral, a concentração do fármaco não influenciou nos parâmetros de diâmetro, PDI e PZ; entretanto, verificou-se que a maior concentração de $AlCl_3$ levou ao aumento do diâmetro das nanopartículas e a redução do caráter aniônico, provavelmente devido a interação com maior quantidade de cargas negativas presentes nas cadeias poliméricas.

5.3.2 Análise da morfologia e tamanho das nanopartículas reticuladas e não reticuladas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

Diferentes técnicas de microscopia podem ser utilizadas para observar a morfologia das nanopartículas e suas estruturas. A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV) é uma das mais versáteis técnicas disponíveis para a observação e análise de características estruturais de materiais sólidos. A aparência tridimensional das imagens é resultante da grande profundidade de campo, permitindo obtenção de imagens de alta resolução (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Neste estudo, a morfologia e o tamanho das nanopartículas reticuladas e não reticuladas foram avaliadas a partir das fotomicrografias (Figura 28) e os resultados de distribuição de tamanho das amostras estão apresentados na Figura 29.

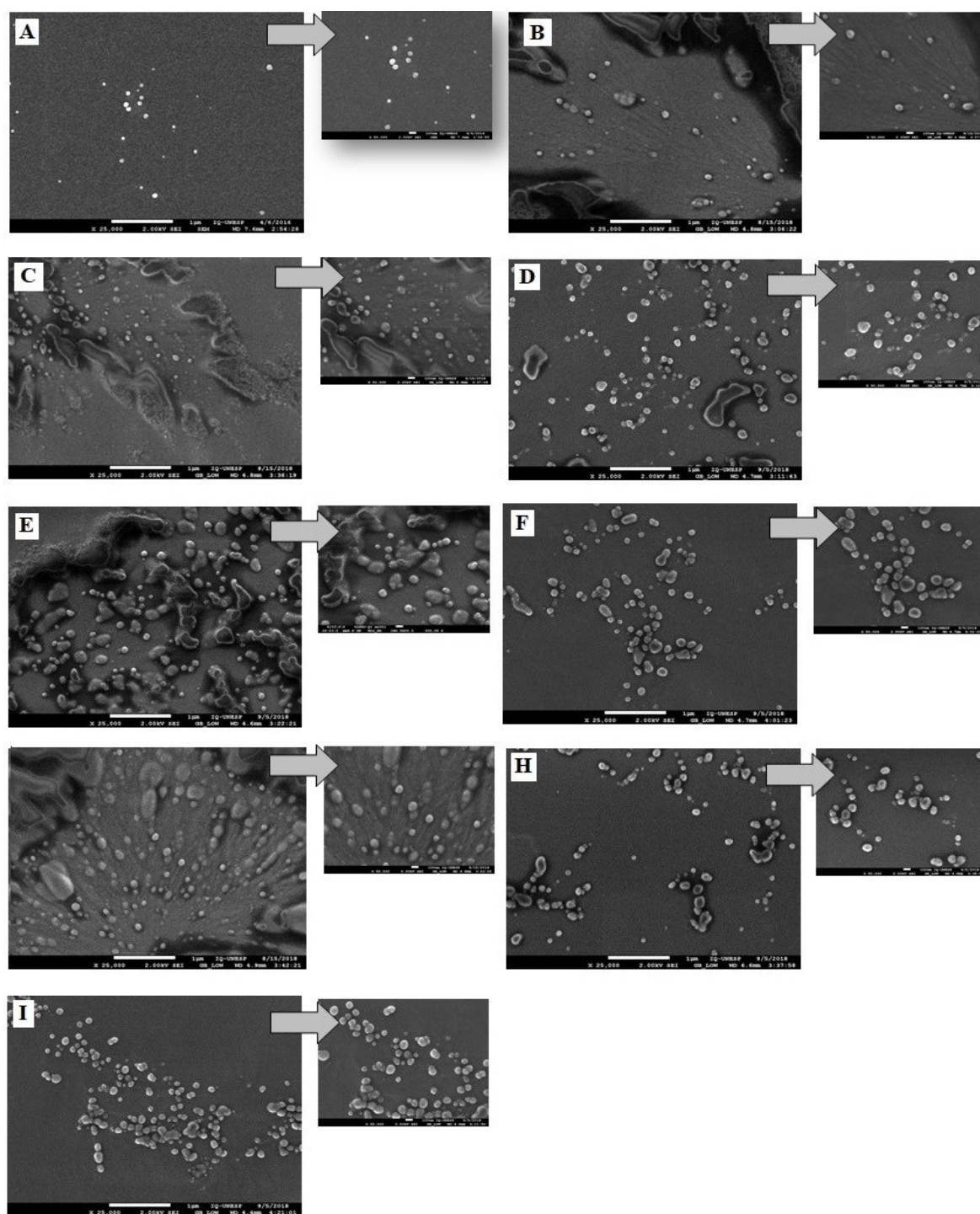


Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas reticuladas e não reticuladas nos aumentos de 25,000x e 50,000x, respectivamente. Legendas A: NP1; B: NP1R1; C: NP1R2; D: NP2; E: NP2R1; F: NP2R2; G: NP3; H: NP3R1; I: NP3R2.

Através da análise qualitativa verificou-se que, de maneira geral, as fotomicrografias evidenciaram a formação das estruturas nanométricas e a forma esférica das nanopartículas.

Para as nanopartículas não reticuladas (NP1, NP2 e NP3), observou-se que o diâmetro foi proporcional a concentração do BVZ, ou seja, quanto a maior a concentração de BVZ maior foi o diâmetro das nanopartículas ($p < 0,05$) (Tabela 9). Esse comportamento pode ser atribuído a distribuição das moléculas de BVZ entre os espaços intersticiais das cadeias poliméricas levando a expansão da estrutura e, portanto, aumento do diâmetro.

Essa tendência de aumento de diâmetro com aumento de concentração de fármaco foi descrita por Boni e colaboradores (2018), em estudos com nanopartículas a base de quitosana e ácido hialurônico carregadas com metotrexato.

Tabela 9. Valores de diâmetro médio das nanopartículas reticuladas e não reticuladas

Amostras	Diâmetro médio (nm) (Média \pm DP)
NP1	58,72 \pm 19,03
NP1R1	84,09 \pm 36,42
NP1R2	74,03 \pm 17,28
NP2	85,66 \pm 23,59
NP2R1	99,85 \pm 26,14
NP2R2	95,44 \pm 21,99
NP3	104,31 \pm 24,30
NP3R1	97,30 \pm 21,51
NP3R2	88,82 \pm 18,24

As nanopartículas reticuladas, de modo geral, apresentaram maior diâmetro que suas contrapartidas não reticuladas (NP1, NP2 e NP3), independente da concentração do fármaco ($p < 0,05$). Provavelmente, a reticulação deve ter contribuído para o aprisionamento de maior número de moléculas do fármaco permitindo a construção de uma estrutura mais volumosa e rígida, e conseqüente aumento do tamanho. Adicionalmente, a reticulação deve contribuído para a formação de uma rede estrutural mais expandida e rígida.

Esse comportamento também foi relatado por Cardoso (2012), em estudos com micropartículas a base de GG/AR, e por Prezotti e colaboradores (2014), em estudos com sistemas microparticulados a base de GG e pectina, os quais observaram que a máxima

concentração de Al^{3+} (5%) levava ao aumento do tamanho das partículas.

As imagens (Figura 28) revelaram ainda a presença de alguns aglomerados, provavelmente atribuído ao processo de secagem das nanopartículas, durante o preparo das amostras, ou ainda devido a presença de polímeros não complexados.

A partir das fotomicrografias obtidas, realizou-se a medida do diâmetro de Ferret 0° para uma população de 100 nanopartículas, e os perfis de distribuição de tamanho das amostras estão apresentados na Figura 29.

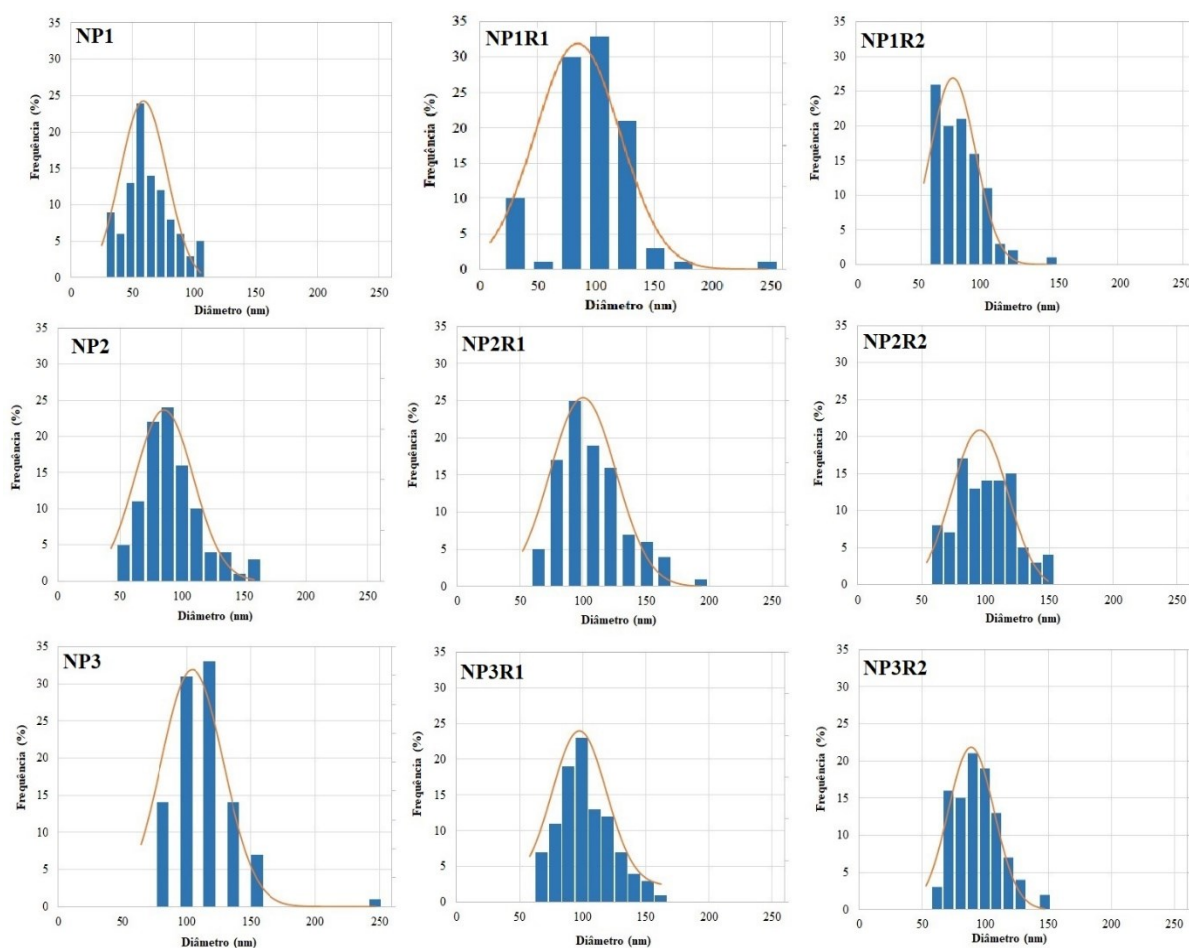


Figura 29. Distribuição granulométrica das nanopartículas reticuladas e não reticuladas.

De modo geral, os perfis de distribuição demonstraram que o tamanho das nanopartículas reticuladas ou não variaram entre 50 – 247 nm.

As nanopartículas não-reticuladas NP1, NP2 e NP3 (Figura 29) apresentaram percentual de 71, 83 e 99 % das nanopartículas com diâmetros de 49 – 155 nm.

A NP1 foi a que exibiu menor diâmetro (< 105 nm), como mostra a Figura 29, com uma distribuição deslocada para uma faixa de diâmetros menores. Aproximadamente 71 % da

população de nanopartículas apresentaram tamanhos variando entre 48 – 80 nm.

A concentração de BVZ dessa amostra é menor (0,15 mg/mL) em relação a mistura polimérica (0,35 mg/mL) e, provavelmente, nesse caso a maior quantidade de grupamentos ionizáveis disponíveis nas cadeias poliméricas deve ter permitido uma maior interação com as moléculas de BVZ levando a formação de uma estrutura mais compactada.

Para as amostras reticuladas (Figura 29), de maneira geral, os perfis de distribuição foram semelhantes, com percentuais de 73% a 94% da população de nanopartículas com tamanhos variando entre 51 e 247 nm.

Os diâmetros observados nos perfis de distribuição de tamanho (Figura 29) foram aproximadamente três vezes menores que aqueles observados na análise de tamanho pela técnica de DLS (item 4.2.3.1). As medidas obtidas com essa técnica correspondem ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas dispersas em meio líquido. Nesse sentido, os maiores valores de diâmetro observados durante a análise em DLS pode ser atribuído ao intumescimento das nanopartículas em meio líquido, decorrente da ionização dos grupos carboxílicos (COOH) e dos grupos hidroxilas (OH) presentes nas cadeias dos polímeros aniônicos, GG e AR respectivamente, que promoveram a repulsão das cadeias poliméricas e dilatação da rede. Nesse sentido, as medidas obtidas com a análise por DLS devem ser mais representativas do tamanho das partículas quando em ambiente fisiológico.

5.3.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) com refletância total atenuada (ATR) das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas

A espectroscopia de absorção na região IV é uma técnica analítica capaz de fornecer informações importantes sobre a composição química, grupos funcionais, tipos de ligação e conformações moleculares de substâncias químicas (TALARI et al., 2017).

O processo de absorção na região do IV ocorre quando as moléculas absorvem radiação e passam do estado fundamental para o estado excitado. Essas alterações de energia são da ordem de 8 a 40 KJ/mol, e a radiação nessa faixa de energia engloba, basicamente, frequências vibracionais de estiramento (ou deformações axiais) e dobramento (ou deformação angular) das ligações estruturais das moléculas (PAVIA et al., 2010).

Os espectros de IV do BVZ, dos polímeros (GG e AR) e das nanopartículas reticuladas e não reticuladas estão representados na Figura 30, 31 e 32, respectivamente.

As bandas encontradas no espectro do BVZ (Figura 30), apresentadas na Tabela 10, estão de acordo com os valores relatados na literatura (BARTH, 2000; FABIAN; MÄNTELE,

2002; KONG; YU, 2007). Uma das bandas mais importantes, típicas de proteínas como BVZ, é a banda da amida I que corresponde a 80% do estiramento do grupo carbonila (C=O), 10% de deformação angular CNH e 10% de estiramento CN. Essa banda está diretamente relacionada à estrutura em folha- β (DONG; HUANG; CAUGHEY, 1990; MURPHY et al., 2012), característico de proteínas globulares.

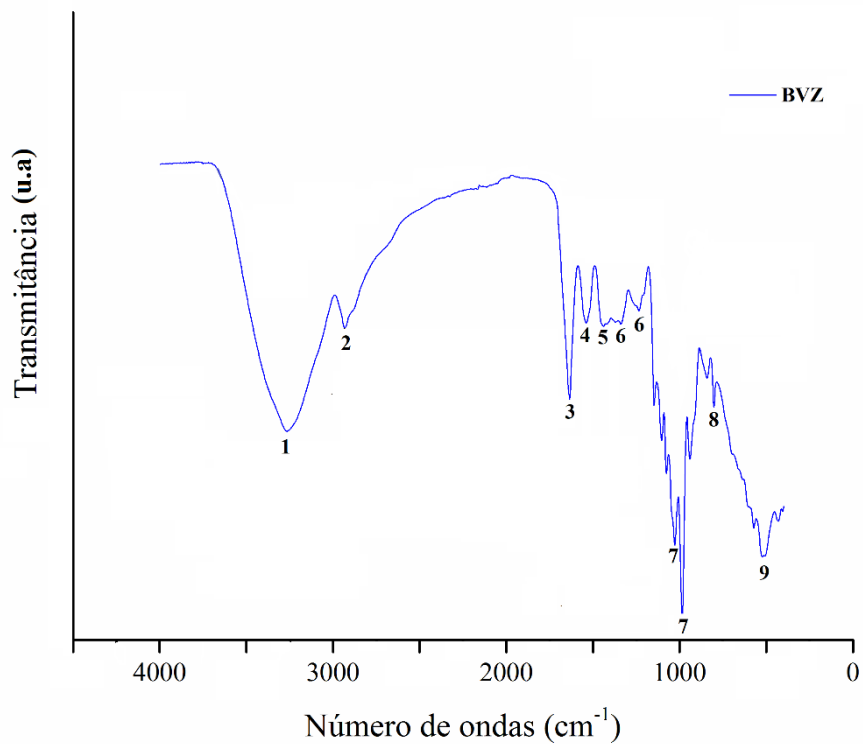


Figura 30. Espectro de absorção na região do infravermelho do BVZ.

Tabela 10. Bandas características do BVZ.

Picos na Figura 30	Bandas	Frequência (cm^{-1})	Descrição
1	Amida A	3273	Estiramento da ligação N-H
2	Amida B	2930	Estiramento da ligação N-H
3	Amida I	1638	Estiramento da ligação C=O
4	Amida II	1545	Estiramento da ligação C-N e dobramento no plano N-H
5	Resíduos do aminoácido prolina	1436	Estiramento da ligação C-N
6	Amida III	1320	Estiramento da ligação C-N
		1230	Dobramento no plano da ligação N-H
7	Resíduos de aminoácido serina	1030	Estiramento da ligação C-O
		982	Estiramento da ligação C-O ou da ligação C-C
8	Amida V	800	Dobramento fora do plano da ligação N-H
9	Amida VI	516	Estiramento fora do plano de ligação C=O

No espectro da GG (Figura 31) foram observadas bandas em 3300 cm^{-1} , referente ao estiramento dos grupos OH dos ácidos carboxílicos presentes no anel de glicopiranosose da GG. As bandas em 2900 cm^{-1} , 1596 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} e 1018 cm^{-1} correspondem a vibração de estiramento de C-H do grupo CH_2 do aldeído, do estiramento C-C, do estiramento simétrico dos ânions carboxilatos (COO^-) e do estiramento C-O do ácido carboxílico, respectivamente. Essas bandas são características da GG de baixa acetilação e semelhantes àquelas relatadas por Agnihotri e colaboradores (2006) e Pereira e colaboradores (2011).

No caso do amido, alguns autores sugerem que a faixa espectral entre $800\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ pode ser considerada uma "impressão digital" do amido e apresenta bandas de vibrações dos estiramentos C-O e C-C, relacionadas às mudanças conformacionais que o polímero sofre após

o processo de hidratação (HTOON et al., 2009; WANG et al., 2015).

O espectro do AR (Figura 31) exibiu bandas em 3285 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , correspondentes às vibrações de estiramento dos grupos O-H da hidroxila e do C-H de alcanos, respectivamente. Além disso, a banda em 1365 cm^{-1} refere-se ao dobramento C-H do grupo CH_3 do alcano, e as bandas em torno de 1047 e 1000 cm^{-1} são atribuídas às regiões cristalinas e amorfas presentes na estrutura do amido, após a retrogradação. Esses valores estão de acordo com aqueles citados por Karim e colaboradores (2000), Wang e colaboradores (2015) e Ashwar e colaboradores (2016).

O espectro da mistura GG/AR foi bastante semelhante àquele obtido para GG, porém com leve deslocamento para comprimentos de ondas maiores, em relação aos polímeros isolados (Figura 31), indicando a interação entre GG e AR.

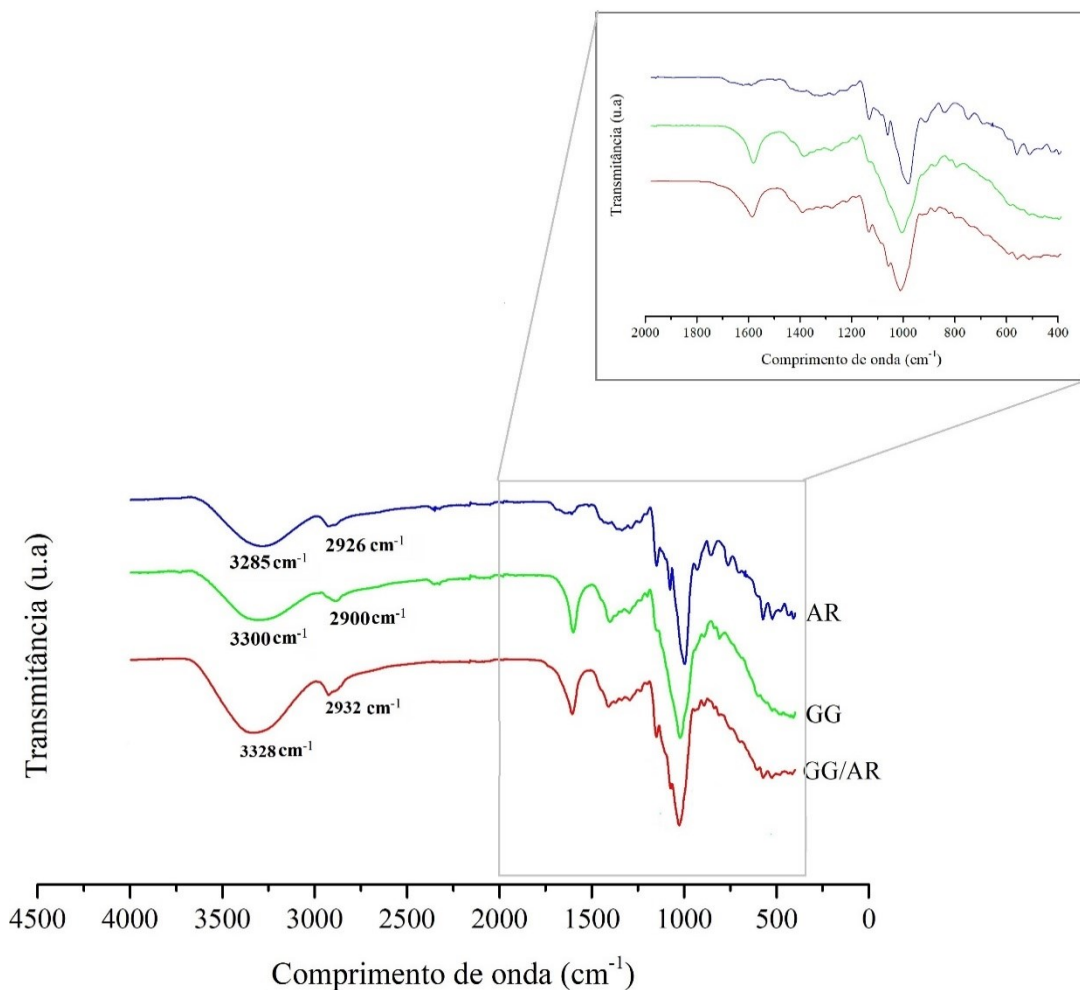


Figura 31. Espectros de absorção na região do infravermelho dos polímeros isolados (GG e AR) e misturas poliméricas GG/AR.

Não foi identificado aparecimento de novas bandas nos espectros das nanopartículas

(Figura 32), uma vez que fármaco e polímeros apresentam bandas de absorção em regiões semelhantes e, de maneira geral, verificou-se que as bandas espectrais do fármaco e polímeros isolados foram mantidas nos espectros das nanopartículas reticuladas e não reticuladas. Além disso, verificou-se um aumento na intensidade dos picos, sugerindo a interação física entre fármaco-polímeros.

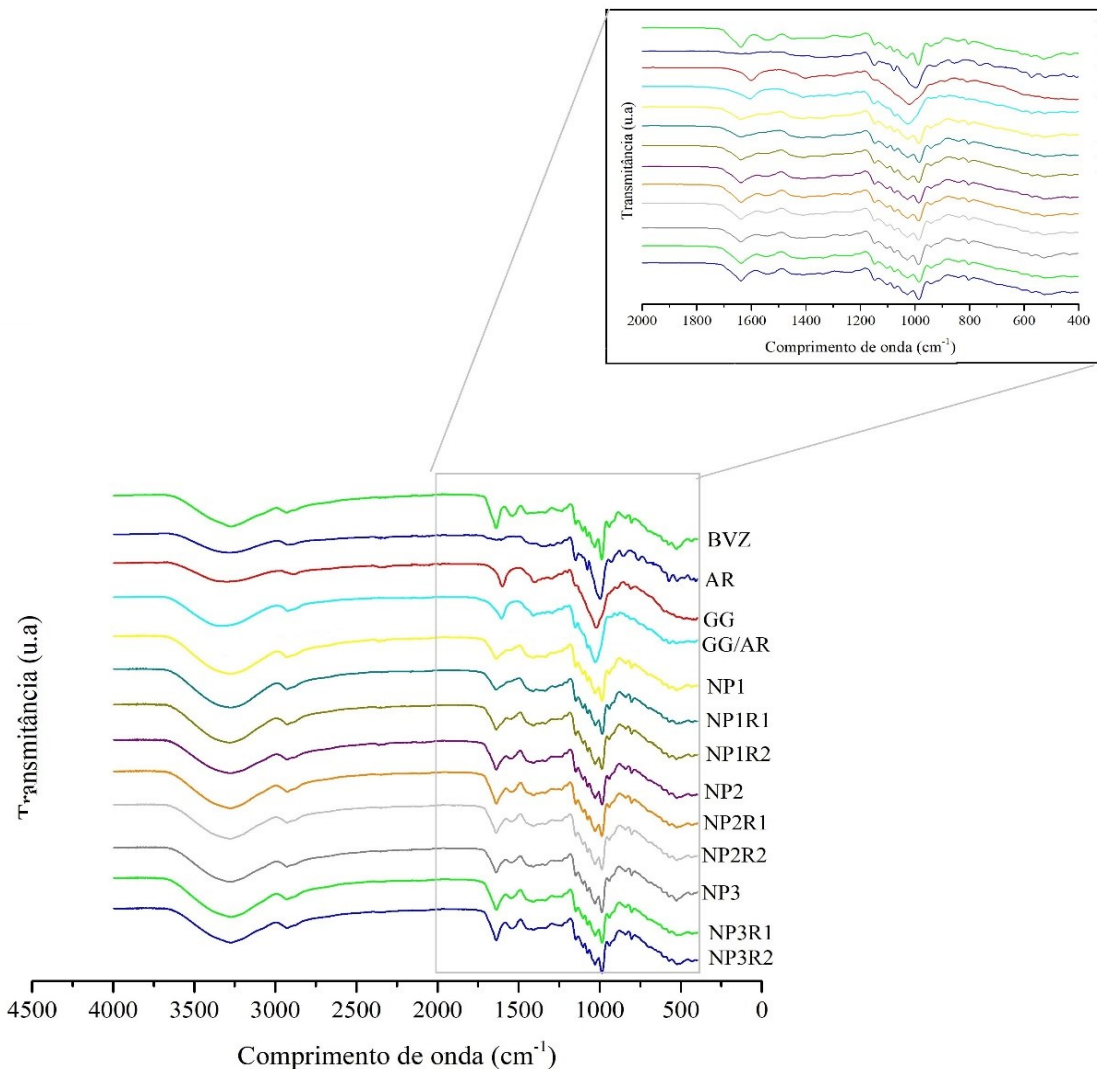


Figura 32. Espectros de absorção na região do infravermelho do BVZ, polímeros (GG e AR), misturas poliméricas (GG/AR) e todas as nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.

5.4 Validação da metodologia analítica para quantificação de BVZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Atualmente, a CLAE de fase reversa tem sido o método mais comumente utilizado na quantificação e caracterização de fármacos proteicos, incluindo mAbs, permitindo uma análise

de alta resolução em um curto período de tempo (SOUSA; GONÇALVES; SARMENTO, 2017).

5.4.1 Conformidade do método cromatográfico

De acordo com Comitê Internacional em Harmonização (do inglês, *International Conference on Harmonisation - ICH*) (2005), os ensaios de adequabilidade do sistema cromatográfico são parte integrante de inúmeros procedimentos analíticos e são realizados com a finalidade de garantir que o equipamento, bem como as operações analíticas e o método validado estejam em conformidade com seus requisitos, a fim de garantir que a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico sejam pertinentes às análises pretendidas (BRASIL, 2017; ICH, 2005; LANÇAS, 2009; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011; USP, 2011). A adequabilidade do sistema cromatográfico foi analisada e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Adequabilidade do sistema cromatográfico: parâmetros avaliados.

Parâmetros	Resultados	Critério de aceitabilidade ^a
Tempo de retenção do BVZ (min)	6,098± 0,028	-
Fator de assimetria (10 %)	2,278 ± 1,157	≤ 2
Fator de cauda (T)	2,571 ± 0,644	T ≤ 2
Número de pratos (N)	66.314,83 ±	N > 2000

^a(SHABIR, 2003).

Na prática, normalmente, proteínas são separadas a partir do modo gradiente de eluição sob elevadas temperaturas. Para garantir o sucesso da metodologia desenvolvida alguns critérios foram respeitados, dentre eles, o uso de uma coluna maior e com poros maiores, devido à elevada massa molar do BVZ. O modo gradiente (Água:Acetonitrila, ambos contendo TFA 0,1%; 97:3, v/v) foi utilizado até 8 min, para completa eluição do BVZ, pois pequenas variações na força de eluição do solvente podem interferir no processo de retenção da proteína. Em seguida foi mantido modo isocrático até 13 min.

O reagente de pareamento de íons, no caso ácido trifluoroacético (TFA 0,1 %) (v/v), foi adicionado à fase móvel com intuito de diminuir as interações iônicas e hidrofóbicas entre o

BVZ e os grupos silanóis da fase estacionária e, assim, aumentar a resolução do pico (FEKETE et al., 2012; FEKETE et al., 2013; SOUSA; GONÇALVES; SARMENTO, 2017). A temperatura da coluna escolhida na metodologia empregada foi 80 °C, uma vez que, segundo Fekete e colaboradores (2012, 2013) a temperatura mais elevada é capaz de aumentar o tempo de retenção, reduzir as interações secundárias entre mAbs e silanóis residuais da coluna, garantindo a simetria e resolução do pico (FEKETE et al., 2012; FEKETE et al., 2013; SOUSA; GONÇALVES; et al., 2017).

Com modo gradiente o BVZ foi eluído com um tempo de retenção de aproximadamente $6,10 \pm 0,029$ min (Figura 33), indicando que o método foi rápido, atributo importante para qualidade das análises laboratoriais.

O pico observado em aproximadamente 2,02 min pode ser resultante das alterações conformacionais e/ou desdobraimento parcial da proteína, ou mesmo devido à formação de agregados, em razão da elevada temperatura resultando no aparecimento de novos picos resultando. Esse comportamento também foi observado por Sousa e colaboradores (2017), durante o desenvolvimento e validação de um método de quantificação do BVZ a partir de nanopartículas à base de ácido poli (ácido lático-co-glicólico).

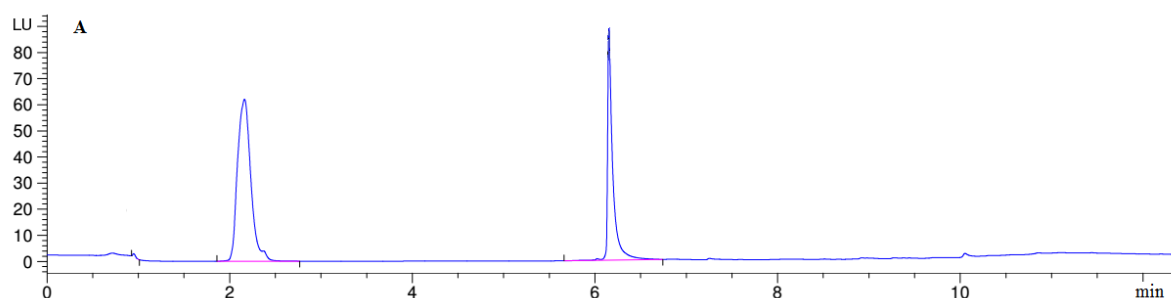


Figura 33. Cromatograma do BVZ (350 µg.mL⁻¹) obtido pelo método cromatográfico proposto CLAE com detecção por fluorescência (λ excitação= 280 nm e λ emissão= 360 nm), em fase móvel ACN:H₂O (97:3).

5.4.2 Especificidade/Seletividade

A especificidade/seletividade baseia-se na capacidade do método em quantificar com exatidão o analito de interesse na presença de substâncias interferentes (BRASIL, 2017), tais como componentes da matriz, impurezas e produtos de degradação. Os resultados foram analisados através da comparação entre os dados obtidos com cromatogramas dos excipientes (Figura 34 A) com o cromatograma do BVZ (Figura 34 B) (BRASIL, 2017).

Os resultados demonstraram que o método foi seletivo e específico, já que não foram identificados qualquer tipo de interferência dos polímeros no tR do BVZ (Figura 34).

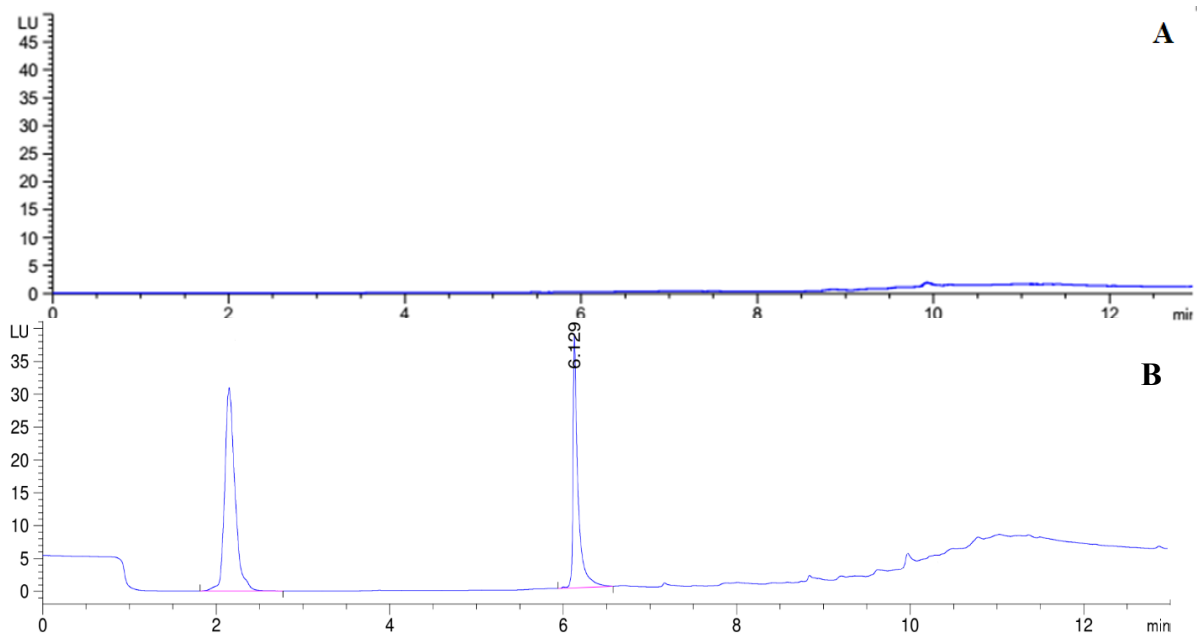


Figura 34. Sobreposição dos cromatogramas da mistura GG, AR e Al^{3+} (A) e do BVZ (B) ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), obtidos em CLAE-fluorescência em 280 nm.

5.4.3 Linearidade

Para garantir a linearidade do método de quantificação, ou seja, demonstrar que, dentro de um intervalo de concentrações pré-determinadas, os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco (BRASIL, 2017; ICH, 2005; USP, 2011), foi construída uma curva analítica das áreas em função da concentração de BVZ (Figura 35). A curva foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, onde a equação da regressão e o coeficiente de correlação (r^2) foram calculados a partir da Equação 14.

$$y = 0,8948x + 18,119 \quad (r^2 = 0,999) \quad \text{Equação 14}$$

Sendo y = área do pico e x = a concentração da solução padrão ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

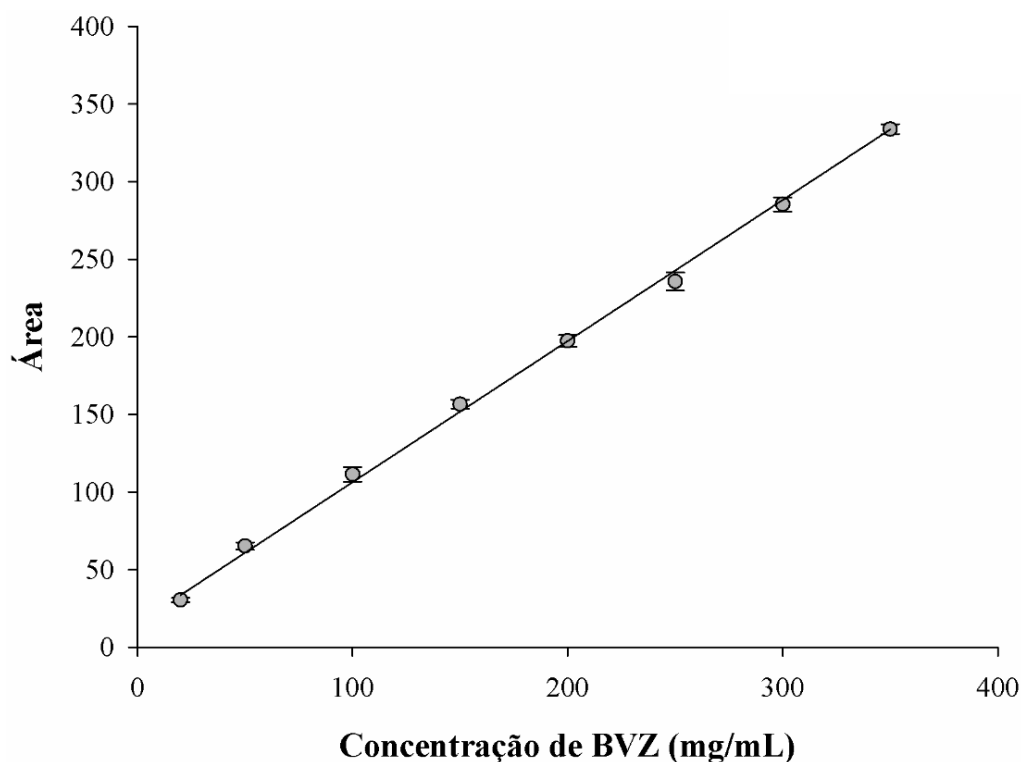


Figura 35. Curva analítica do BVZ obtida a partir do método cromatográfico proposto.

O método analítico desenvolvido apresentou-se linear na faixa de concentração de BVZ de 20 a 350 $\mu\text{g/mL}$. Através dos estudos quimiométricos, utilizando-se software livre Gui Octave, verificou-se que a regressão linear foi altamente significativa, a partir dos dados obtidos, já que F calculado foi muito maior do que o valor de F tabelado, para um nível de 95% de confiança (Tabela 12).

Tabela 12: Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	F calculado	F tabelado
Regressão	236229,3758	1	9035*	$2,92 \times 10^{-30}$
Resíduo	575,1663238	22		
Total	236804,5421	23		

*Significativo para $p < 0,05$

5.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade ou precisão intra-corrída, em que os resultados são obtidos no mesmo equipamento, em curto espaço de tempo, pelo mesmo analista,

e através da precisão intermediária ou inter-corridas, avalia-se os resultados obtidos em dias diferentes, por analistas diferentes (BRASIL, 2017; ICH, 2005; USP, 2011).

A partir dos resultados obtidos (Tabela 13 e 14), concluímos que o método proposto foi preciso para a quantificação do BVZ, já que os coeficientes de variação apresentaram valores de DPR menores do que 5%, conforme preconizados pela Anvisa (2017).

Tabela 13. Resultados obtidos pelo teste de precisão intra-corridas.

Áreas	Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentrações reais (µg/mL)	Concentrações médias experimentais (µg/mL)	D.P	DPR (%)
33,259		16,92			
34,355	25	18,15	17,59	0,62	3,531
33,969		17,71			
177,370		177,97			
177,583	200	178,21	177,46	1,10	0,622
175,775		176,19			
348,077		368,75			
345,048	350	365,37	365,46	3,25	0,888
342,270		362,26			

Tabela 14. Resultados obtidos pelo teste de precisão inter-corridas.

Analistas e dias	Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentrações médias experimental (µg/mL)	D.P	D.P.R (%)
1	25	17,71	0,73	4,104
2		20,01	0,87	4,372
1	200	198,95	5,22	2,622
2		195,79	8,73	4,458
1	350	385,00	7,24	1,879
2		369,02	5,99	1,624

5.4.5 Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor real (BRASIL, 2017; ICH, 2005) e os valores obtidos (Tabela 15) demonstraram que a metodologia analítica empregada foi adequada para a quantificação do BVZ, uma vez que os valores estão entre 80 – 120 %, conforme preconizado pela Anvisa (2017).

Tabela 15. Valores de exatidão.

Concentrações teóricas ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrações médias experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
50	47,04	94,09
200	194,79	97,39
350	367,02	104,86

5.4.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD, que representa a menor quantidade do analíto capaz de ser detectada, e o LQ, que corresponde à menor quantidade do analíto que pode ser quantificada com precisão e exatidão pelo método (BRASIL, 2017) foram avaliados e os valores calculados a partir das equações foram 8,4419 $\mu\text{g/mL}$ e 25,1397 $\mu\text{g/mL}$ para LD e LQ, respectivamente. Esses resultados demonstraram que a metodologia empregada foi capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de BVZ.

5.4.7 Robustez

A robustez do método pode ser mensurada a partir da análise do efeito de pequenas variações durante os ensaios sob alguns parâmetros cromatográficos, como tempo de retenção do pico, exatidão e valor DPR (SILVA *et al.*, 2012).

Os resultados (Tabela 16) mostram que o método foi robusto uma vez que os valores de exatidão estão dentro do intervalo preconizado pela Anvisa (80 %– 120 %).

Tabela 16: Valores de robustez.

Parâmetros	Tempo de retenção (min)	Exatidão (%)
Fluxo	0,8 mL/min	6,304
	1,0 mL/min	5,775
	1,2 mL/min	6,34
Temperatura	78 °C	6,041
	80 °C	6,0978

5.5 Avaliação da eficiência de incorporação (EI %)

A capacidade de encapsulação de uma determinada quantidade de fármaco no interior de uma partícula em relação à massa real adicionada, corresponde à eficiência de encapsulação (AHUJA; YADAV; KUMAR, 2010; CHAN, 2011).

Os valores de EI% do BVZ nos nanosistemas estão apresentados na Tabela 17. O efeito da concentração fármaco e agente reticulante ($AlCl_3$) na eficiência de encapsulação foi avaliado.

A EI% das nanopartículas reticuladas e não reticuladas foi elevada variando entre 56,16 % e 100 %, demonstrando a elevada capacidade dos sistemas em incorporar o BVZ (Tabela 17).

Tabela 17. Eficiência de incorporação nanopartículas reticuladas e não reticuladas.

Amostras	EI (%) + DP
NP1	56,23 ± 2,47
NP1R1	85,24 ± 1,91
NP1R2	100,02 ± 0,18
NP2	56,16 ± 0,50
NP2R1	91,37 ± 0,44
NP2R2	87,67 ± 0,93
NP3	67,81 ± 0,30
NP3R1	93,04 ± 0,16
NP3R2	96,42 ± 0,19

Entre as amostras não reticuladas, a maior EI % foi observada para NP3 ($67,81\% \pm 0,30\%$) ($p < 0,05$), que possui maior concentração de BVZ ($0,35 \text{ mg/mL}$). A maior concentração de BVZ dessa amostra deve ter contribuído para maior EI%, uma vez que o elevado número de molécula do fármaco com carga positiva deve ter interagido com os grupamentos ionizados dos polímeros negativamente carregados até a saturação dos sítios de ligação.

Comportamento semelhante foi relatado por Luangtana-anan e colaboradores (2005), em estudos com nanopartículas de quitosana contendo albumina obtidas pela complexação polieletrólítica. Os autores verificaram que para sistemas contendo quitosanas de diferentes massas moleculares ($35 \text{ kDa} - 800 \text{ kDa}$) quanto maior a massa molar da quitosana maior era a incorporação do fármaco, sendo que nas nanopartículas contendo a quitosana de maior massa molar (800 kDa) a eficiência de incorporação foi em torno de 100%.

Ao comparar todas as amostras reticuladas com AlCl_3 , nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ($p > 0,05$), independente da concentração de AlCl_3 . Entretanto, entre as amostras reticuladas com $0,02 \text{ mg/mL}$ de AlCl_3 (R2), aquela com menor concentração de BVZ ($0,15 \text{ mg/mL}$), NP1R2, exibiu a maior EI % ($100,02 \pm 0,18 \%$) ($p < 0,05$). Provavelmente, maior quantidade de íons Al^{3+} deve ter contribuído para formação de uma malha estruturalmente mais rígida e estável, onde o fármaco, fortemente ligado aos polímeros, permanece aprisionado (Figura 36). Esse dado corrobora os dados de tamanho dessa amostra ($629,87 \pm 27,57 \text{ nm}$) (Tabela 8), uma vez que esta exibiu o maior diâmetro médio hidrodinâmico, provavelmente devido à maior quantidade de moléculas de BVZ encapsulada.

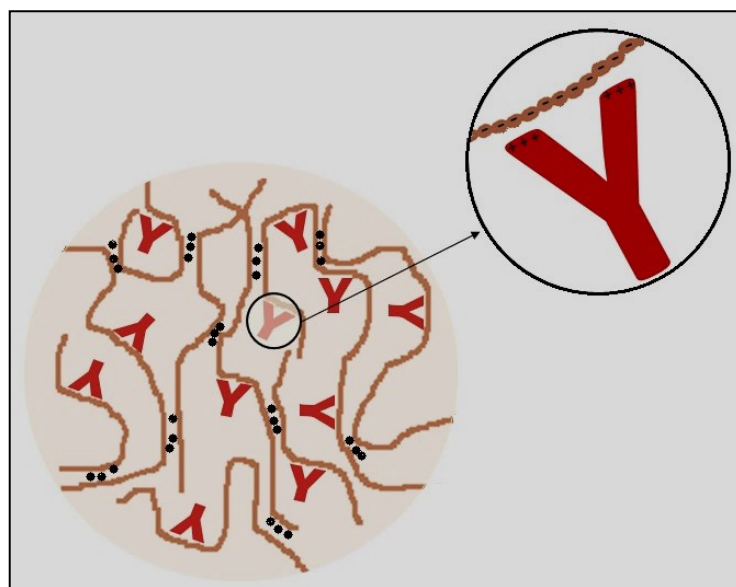


Figura 36. Localização do BVZ na rede estrutural das nanopartículas reticuladas.
Fonte: Adaptado de: SCHWEIZER; SCHÖNHAMMER; et al. (2013).

Através da comparação entre as nanopartículas não-reticuladas e reticuladas, verificou-se que, de maneira geral, o processo de reticulação iônica aumentou (~ 2 vezes) a EI%, independentemente da concentração do AlCl_3 (0,015 ou 0,02 mg/mL) ($p < 0,05$). Esse comportamento pode ser devido a rápida reticulação promovida pelos íons trivalentes (Al^{3+}), minimizando a perda do fármaco para meio dispersante. Esses resultados são coerente e corroboram aqueles verificados no item 5.3.1 (Tabela 8), os quais as nanopartículas reticuladas exibiram maior diâmetro.

Comportamento descrito acima também foi relatado por Reddy e Tammishetti (2002), em estudos com partículas de goma guar contendo albumina. Os autores verificaram que a reticulação utilizando íons Al^{3+} ocorre de maneira mais efetiva, em relação aos íons divalentes, promovendo a maior encapsulação da albumina.

A elevada eficiência de incorporação de fármacos de origem proteica utilizando as técnicas de complexação polieletrólítica e reticulação iônica associadas foi demonstrada em estudos recentes. Aproximadamente $67,6 \pm 6,7$ % do BVZ foi incorporado em nanopartículas de quitosana obtidas através da reticulação iônica (BADIEE et al., 2018). Adicionalmente, em estudos com nanopartículas de quitosana carregadas de insulina obtidas por complexação polieletrólítica os percentuais de eficiência de incorporação foram elevados, variando entre 62,4 – 80,5 % (NAM et al., 2010).

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que reticulação iônica das nanopartículas obtidas pela complexação polieletrólítica permitiu a formação de uma estrutura que pode ser fisicamente mais estável e capaz de incorporar maior quantidade do BVZ.

5.6 Estudos da estrutura conformacional do BVZ após obtenção das nanopartículas e nanopartículas reticuladas

5.6.1 Análise da estrutura secundária do BVZ por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica experimental muito bem estabelecida que permite uma análise rápida com amostras no estado líquido, sólido ou semissólido. A técnica, que se baseia na interação da radiação IV com a amostra, mede o comprimento de onda e a intensidade de absorção dessa radiação, estimulando movimentos vibracionais na molécula, o que permite a obtenção de informações importantes, em nível estrutural e molecular, de compostos químicos pequenos e até mesmo de

sistemas mais complexos como células, tecidos e proteínas (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009; DUYGU et al., 2009; IOANNOU; DONALD; TROMP, 2015; KONG; YU, 2007; MOVASAGHI; REHMAN; UR REHMAN, 2008).

Os dados espectrais de IV foram obtidos a partir do acessório ATR (do inglês, *Attenuated Total Reflection*), pelo método de reflexão total atenuada (cristal de diamante), que tem demonstrado ser bastante útil em estudos da estrutura secundária e outras propriedades das proteínas em diferentes ambientes (KONG; YU, 2007).

Os aminoácidos de uma proteína são unidos por ligações peptídicas, as quais envolvem a perda de uma molécula de água após a ligação entre grupo amina ($-NH_2$) de um aminoácido e o grupo carboxílico ($-COOH$) do outro. A modificação da ligação peptídica após essa interação dá origem à função química amida (Figura 37) (GALLAGHER, 2009).

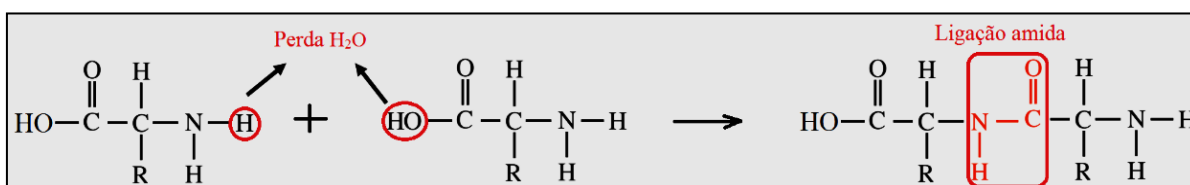


Figura 37. Formação da ligação amida. (Fonte: autoria própria).
Fonte: Autoria própria

Nos dados espectrais de proteínas, as vibrações dessa unidade de repetição originam nove bandas de absorção IV nomeadas amidas A, B e I – VII (KONG; YU, 2007). As bandas amidas I e II são as duas mais importantes bandas do esqueleto da proteína, pois referem-se a informações relacionadas à estrutura secundária de proteínas, uma vez que ambas as ligações $C=O$ e $N-H$ estão envolvidas na ligação de hidrogênio que ocorre entre os aminoácidos da cadeia estrutural. As demais bandas de vibração da amida são muito complexas e de pouca utilidade prática nos estudos conformacionais de proteína (GALLAGHER, 2009; MATHEUS; FRIESS; MAHLER, 2006; SOUSA; SARMENTO; NEVES-PETERSEN, 2017).

As bandas amida I (1700 cm^{-1} - 1600 cm^{-1}) são correspondentes às vibrações do estiramento da ligação $C=O$, e são sensíveis às pequenas variações na geometria da molécula e nos padrões das ligações de hidrogênio das ligações peptídicas de uma determinada proteína. Por outro lado, a banda da amida II é proveniente da vibração resultante do dobramento no plano de $N-H$, que corresponde a 40 - 60% do potencial energético da molécula, e da vibração resultante do estiramento de $C-N$, correspondente a 18 - 40 %. Entretanto, a banda amida II apresenta menor sensibilidade a mudanças conformacionais da proteína em relação a amida I

(GALLAGHER, 2009; MATHEUS et al., 2006; SOUSA; SARMENTO; et al., 2017). Dessa forma, neste estudo o foco foi a análise da banda da amida I, uma vez que esta vem sendo a mais utilizada para demonstrar a integridade estrutural de folhas- β de proteínas, como mAbs (MURPHY et al., 2012).

Considerando a complexidade da banda de amida I, métodos para aumentar a resolução, como a segunda derivada obtida a partir dos espectros de IV são amplamente utilizados para garantir a separação dos picos e melhorar a resolução, bem como a correlação de suas áreas, ou intensidade das bandas, os quais podem trazer informações importantes em relação ao conteúdo da estrutura secundária de proteínas.

A Figura 38 mostra a segunda derivada dos espectros de IV da banda da amida I, entre $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$, do BVZ, nanopartículas reticuladas ou não.

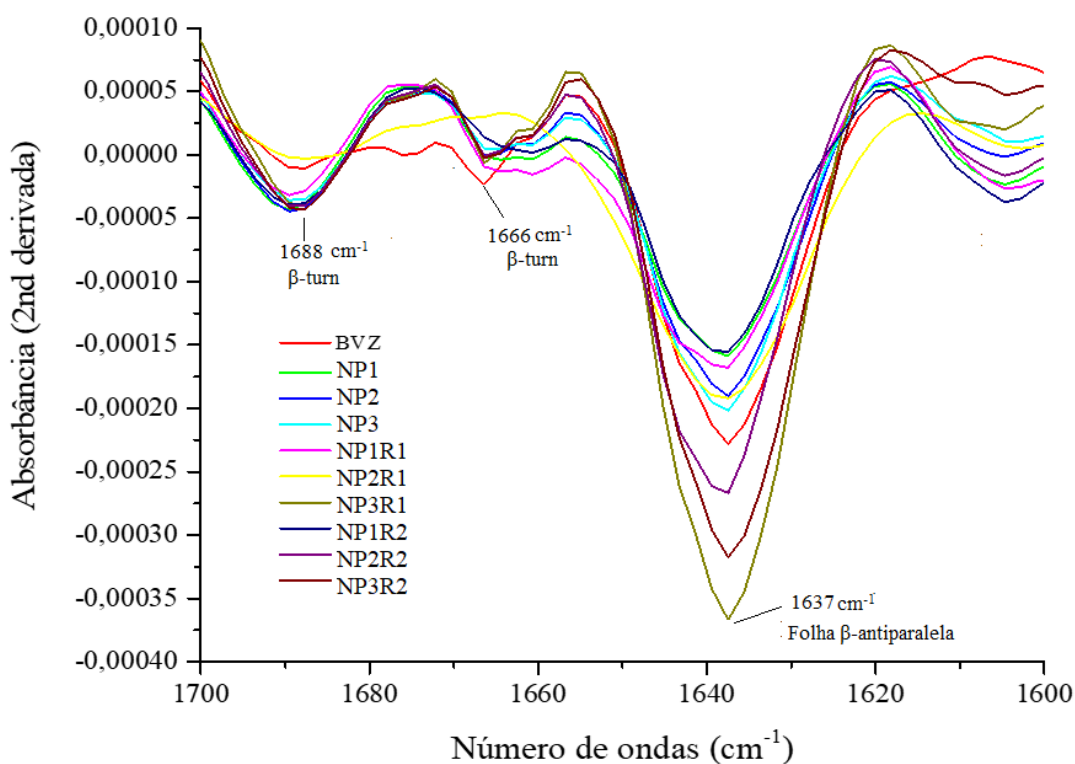


Figura 38. Segunda derivada dos espectros de FTIR do fármaco e amostras.

Considerando que o BVZ é uma imunoglobulina do tipo G (IgG) foram verificadas duas bandas características, uma entre $1630 - 1640 \text{ cm}^{-1}$ e outra entre $1690 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, relativo às estruturas em folhas- β (DONG et al., 1990; MURPHY et al., 2012; SOUSA; SARMENTO; et al., 2017; YANG et al., 2015).

A Figura 38 mostra que a estrutura secundária do BVZ foi mantida em todas as amostras, sugerindo que os processos de complexação polieletrólítica e reticulação iônica, não danificaram a estrutura secundária do BVZ, que é dominada por folhas- β intramolecular, cuja banda foi exibida em 1637 cm^{-1} , característico de proteínas globulares, e por volta- β (ligações entre duas folhas β) cujas bandas foram exibidas em 1666 cm^{-1} e 1688 cm^{-1} . Esses valores são semelhantes àqueles relatados por Kong e Yu (2007) e Yang e colaboradores (2015).

A intensidade da banda em 1637 cm^{-1} , relacionada a folha- β antiparalela, variou entre as amostras, sendo a maior intensidade observada em NP3R1, NP3R2 e NP2R2. Provavelmente, essas variações na intensidade dos picos estão relacionadas as modificações específicas nos percentuais de estruturas secundárias de proteínas devido as interações intermoleculares, que ocorrem após a formação dos complexos, ou ainda devido a uma possível reorganização estrutural do BVZ no sistema sem, no entanto, perder sua conformação estrutural. De acordo com Ioannou e colaboradores (2015) é possível que essas variações na intensidade dos picos também ocorram em função da concentração da proteína.

5.6.2 Análise da estrutura terciária do BVZ por espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é uma transição radioativa que envolve a liberação de fótons, e baseia-se em três eventos importantes, sendo eles a excitação, relaxação e emissão do fóton. A excitação (processo de absorção de luz) ocorre quando o fluoróforo absorve um fóton levando o elétron do orbital de nível mais baixo (estado fundamental) ao nível vibracional mais alto estado eletrônico excitado. Em seguida, ocorre o processo de relaxação (conversão interna) e a energia é dissipada levando o fluoróforo ao nível vibracional do estado fundamental. Por fim, ocorre a emissão do fóton (processo de fluorescência propriamente dito), que baseia-se no retorno da molécula ao estado fundamental, resultando na dissipação de energia, parte na forma de calor e parte na forma de luz (SABATINI, 2012; VENTURINI, 2017).

Em compostos orgânicos, o fenômeno de fluorescência ocorre principalmente nas estruturas aromáticas. Nas proteínas, os fluoróforos intrínsecos são compostos, principalmente, pelos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, sendo este último o fluoróforo mais importante (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014). Nesse sentido, a fluorescência do triptofano, que absorve luz na faixa de 280 nm e emite entre 320-350 nm, é a mais relevante para investigar alterações conformacionais em proteínas (CAMPANA, 1998; ROYER, 2006).

Ao entrar em contato com o ambiente aquoso, o triptofano emite fluorescência, sendo esta altamente sensível à polaridade do meio em que está disperso. Segundo Huang e

colaboradores (2016), os resíduos de triptofano podem apresentar emissão de fluorescência em comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}) que variam entre 307 e 355 nm, de acordo com as propriedades do solvente, do grau de exposição ao solvente e de outras interações locais, sendo categorizados em cinco classes, A ($\lambda_{\text{max}}=307$ nm), S ($\lambda_{\text{max}}=316-317$ nm), I (λ_{max} entre 330-332 nm), II (λ_{max} entre 340-342 nm) e III (λ_{max} entre 350-353 nm) (RESHETNYAK; BURSTEIN, 2001).

Nesse estudo, para avaliar a integridade da estrutura terciária do BVZ utilizou-se como sonda a fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano do BVZ livre, nas concentrações 0,15 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,35 mg/mL, e incorporado nas nanopartículas reticuladas e não-reticuladas. Outro parâmetro avaliado foi o centro de massa espectral [λ], média ponderada dos espectros que reflete o grau de exposição do triptofano ao ambiente polar e alterações sofridas na estrutura de proteínas (BALNY; MASSON; HEREMANS, 2002).

A Figura 39 mostra os espectros normalizados de fluorescência intrínseca do BVZ, das nanopartículas reticuladas e não reticuladas.

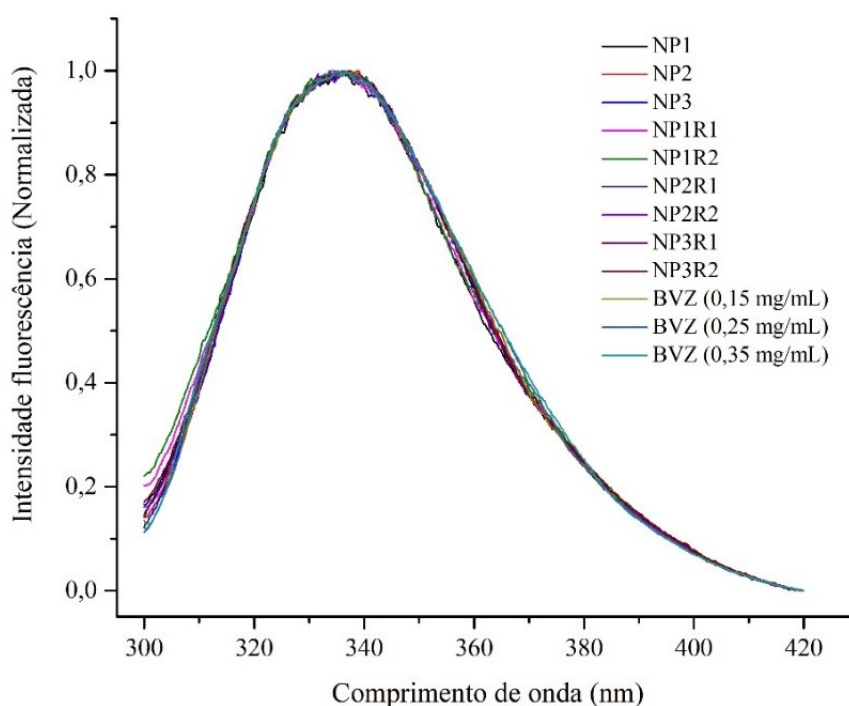


Figura 39. Espectros de fluorescência intrínseca do BVZ livre e incorporado nas nanopartículas reticuladas e não reticuladas.

A Figura 40 mostra que o BVZ livre nas diferentes concentrações (0,15 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,35 mg/mL) apresentou λ_{\max} emissão e $[\lambda]$ em torno de 336 nm e 345 nm, respectivamente (Tabela 18), valores característicos de proteínas do tipo IgG, sendo os picos relativos aos resíduos de triptofano da classe II, categorizados por aqueles presentes naturalmente na superfície de proteínas em contato com grupos polares da água (HUANG et al., 2016).

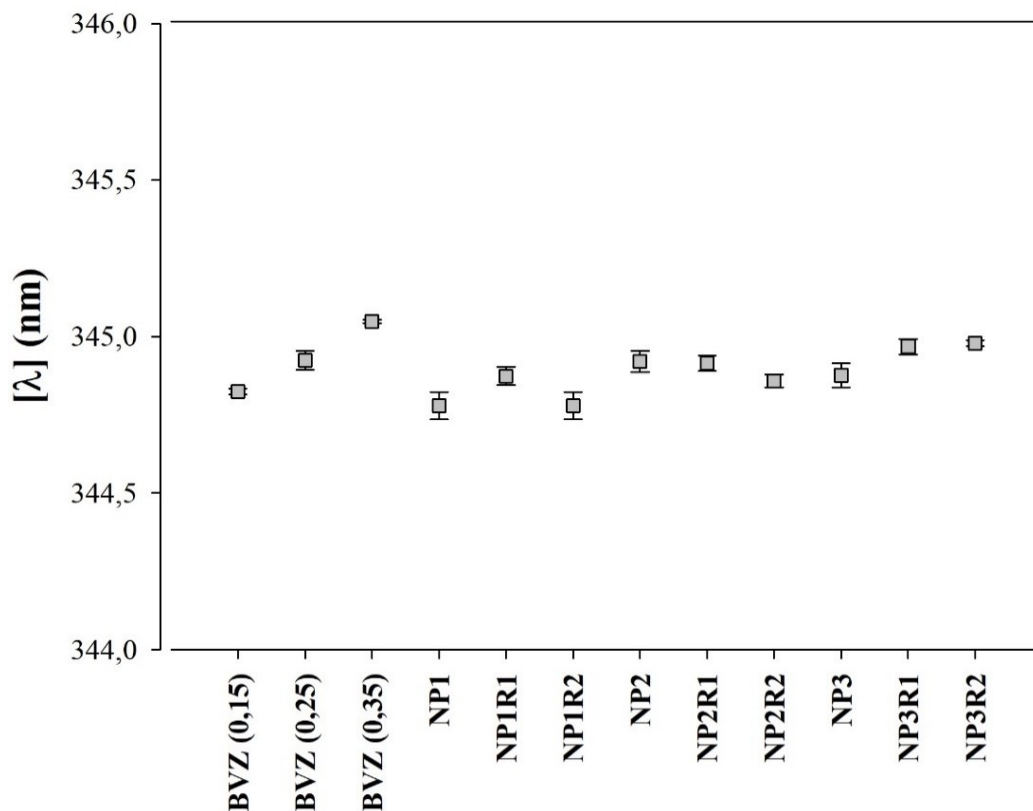


Figura 40. Centro de massa espectral do BVZ livre e das nanopartículas reticuladas e não reticuladas.

Para todas as nanopartículas, reticuladas e não reticuladas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os valores de λ_{\max} e $[\lambda]$, mesmo em relação ao BVZ livre ($p > 0,05$) (Tabela 18), indicando que os resíduos da classe II foram mantidos na superfície da proteína em todas as amostras e que o processo de complexação polieletrólítica e reticulação iônica não afetaram sua estrutura nativa.

Tabela 18. Dados espectrais de fluorescência do BVZ, nanopartículas reticuladas e não-reticuladas (n=3).

Amostras	$\lambda_{\text{máx}} \text{ emissão}$ (nm)	[λ] (nm)
BVZ (0,15 mg/mL)	337 \pm 1	344,8
BVZ (0,25 mg/mL)	335 \pm 2	344,9
BVZ (0,35 mg/mL)	336 \pm 1	345,0
NP1	336 \pm 1	344,8
NP1R1	335 \pm 2	344,9
NP1R2	336 \pm 1	344,8
NP2	337 \pm 1	344,9
NP2R1	337 \pm 1	344,9
NP2R2	337 \pm 1	344,9
NP3	335 \pm 2	344,9
NP3R1	336 \pm 1	345,0
NP3R2	336 \pm 1	345,0

Os resultados evidenciaram que as técnicas de complexação polieletrólítica e reticulação iônica mostraram-se adequadas, pois a estrutura terciária do BVZ foi mantida após a obtenção das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas, corroborando os resultados da análise por espectroscopia de absorção na região do IV (item 5.6.1) que revelaram que a integridade da estrutura secundária do BVZ foi preservada.

A técnica de complexação polieletrólítica, bem como a reticulação iônica, apresentam vantagens tecnológicas como condições reacionais amenas, evitando o uso de solventes orgânicos, meio com valores extremos de pH e elevada temperatura, os quais normalmente são responsáveis por processos de desnaturação de proteínas. Nesse sentido, sugere-se que as interações entre polímeros e BVZ pode ter levado a formação de uma estrutura mais organizada, o qual deve ter sido fortalecida pela presença do agente reticulante, promovendo o aprisionamento do BVZ no interior da partícula, como mostra a Figura 20 do item 5.2.1.2.

5.6.3 Análise da conformação estrutural do BVZ por microcalorimetria exploratória diferencial (nanoDSC).

A análise por nanoDSC é uma técnica que permite avaliar diretamente a capacidade de

absorção de energia térmica de uma determinada substância, a partir do aumento ou diminuição da temperatura de maneira controlada. Como uma poderosa ferramenta analítica, a nanoDSC é uma técnica amplamente utilizada para obter informações do estado nativo, de enovelamento ou desenovelamento de proteínas, bem como da estabilidade térmica dessas biomacromoléculas (GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010b), que pode ser fortemente influenciada pela sua associação com matrizes poliméricas durante a obtenção de nanopartículas (ANDREANI et al., 2015).

A técnica fundamenta-se no registro de eventos térmicos em função da variação da temperatura, associados à desnaturação térmica ou rompimento das interações, que mantém a estrutura das biomoléculas, quando esta é submetida a uma taxa de aquecimento. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das análises de nanoDSC dizem muito a respeito do estado estrutural de proteínas. Alterações na capacidade calorífica de uma proteína, por exemplo, podem indicar a quebra das ligações que estabilizam sua estrutura, como interações de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, ligações de hidrogênio (CHIU; PRENNER, 2011; GILL et al., 2010b).

A análise foi realizada em uma faixa de temperatura de 25 °C – 100 °C, de acordo com método proposto por Andreani e colaboradores (2015). A Figura 41 mostra as curvas de nanoDSC do BVZ livre e incorporado as nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.

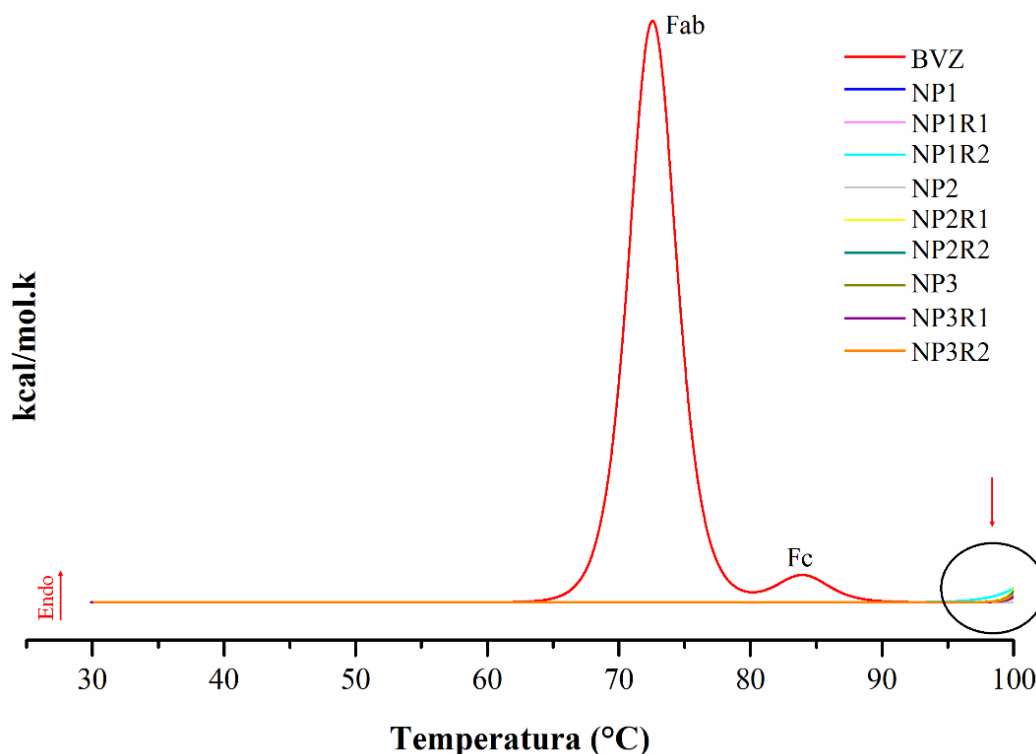


Figura 41. Curva de nanoDSC do BVZ em solução aquosa e das nanopartículas reticuladas e não reticuladas.

O BVZ apresenta quatro cadeias polipeptídicas, características de imunoglobulinas do tipo IgG, que estão unidas por ligações dissulfeto e outras ligações supramoleculares. Essas quatro cadeias polipeptídicas estão agrupadas em fragmentos, sendo dois fragmentos Fab (fragmento de ligação do antígeno) idênticos e um fragmento Fc (fragmento cristalizável), os quais dão origem a conformação estrutural em “Y” da proteína (Vermeer e Norde, 2000; Ionescu *et al.*, 2008). Na curva de nanoDSC do BVZ verificou-se que transições endotérmicas que correspondem ao desdobramento dos domínios do fragmento de ligação ao antígeno Fab e Fc ocorreram em temperaturas distintas, em 72,5 °C e 83,5 °C, respectivamente. Esses resultados já foram previamente relatados em outros estudos (IONESCU *et al.*, 2008; VERMEER; NORDE, 2000).

Os picos relacionados aos dois eventos endotérmicos do BVZ não foram exibidos na curva de nanoDSC das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas, indicando o deslocamento da temperatura de desnaturação (T_m) para temperaturas mais elevadas (acima de 100 °C) (como mostra a seta na Figura 41), o que indica que a complexação do BVZ com poliânions (GG e AR) pode ter aumentado a estabilidade térmica da proteína, em que maior energia térmica foi necessária para promover a desnaturação do BVZ quando complexado aos polímeros. Esse resultado corrobora os dados de fluorescência (item 5.6.2).

O efeito de polissacarídeos naturais na estabilidade térmica de sistemas de liberação também foi evidenciado em outros trabalhos por nosso grupo de pesquisa (Cardoso, 2014; Ferreira *et al.*, 2017).

Com o propósito de avaliar a ocorrência de outros eventos térmicos, que provavelmente ocorrem em temperaturas mais elevadas, a análise através DSC foi realizada, uma vez que essa análise permite avaliar os eventos em uma faixa de temperatura mais ampla.

5.6.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A DSC, que consiste no aquecimento ou resfriamento de uma determinada substância química, tem sido bastante empregada no sentido de obter informações sobre eventos térmicos de materiais, como fusão, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição (READING; CRAIG, 2006).

A técnica baseia-se na medida da diferença entre o fluxo de calor de uma determinada substância e um material de referência termicamente inerte (BOND *et al.*, 2002; CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999), possibilitando a identificação e transição de polimorfos, caracterização de materiais poliméricos, determinação da pureza de fármacos e interações entre

fármaco e excipientes, bem como o estudo de compatibilidade entre componentes das formulações (BHARVADA; SHAH; MISRA, 2015; STORPIRTIS et al., 2000).

Os eventos térmicos registrados pela técnica DSC são temperatura de fusão endotérmica, ou seja, temperatura de início da fusão dos cristais (*Tonset*); a temperatura do pico (*Tpeak*), relativo ao ponto de fusão da maioria dos cristais; a temperatura final (*Tendset*), que representa a fusão dos cristalitos mais perfeitos e a entalpia de fusão (ΔH) correspondente à área de transição endotérmica (READING; CRAIG; 2007; ZHOU; DI VONA; KNAUTH, 2010).

Neste estudo, as análises de DSC foram empregadas para avaliar a compatibilidade entre os componentes das amostras, a estabilidade térmica dos materiais, bem como as possíveis alterações físico-químicas após a formação das nanopartículas.

As curvas de DSC obtidas para o BVZ, polímeros isolados e misturas poliméricas estão apresentadas nas Figuras 42. Os valores dos parâmetros calorimétricos estão listados na Tabela 19.

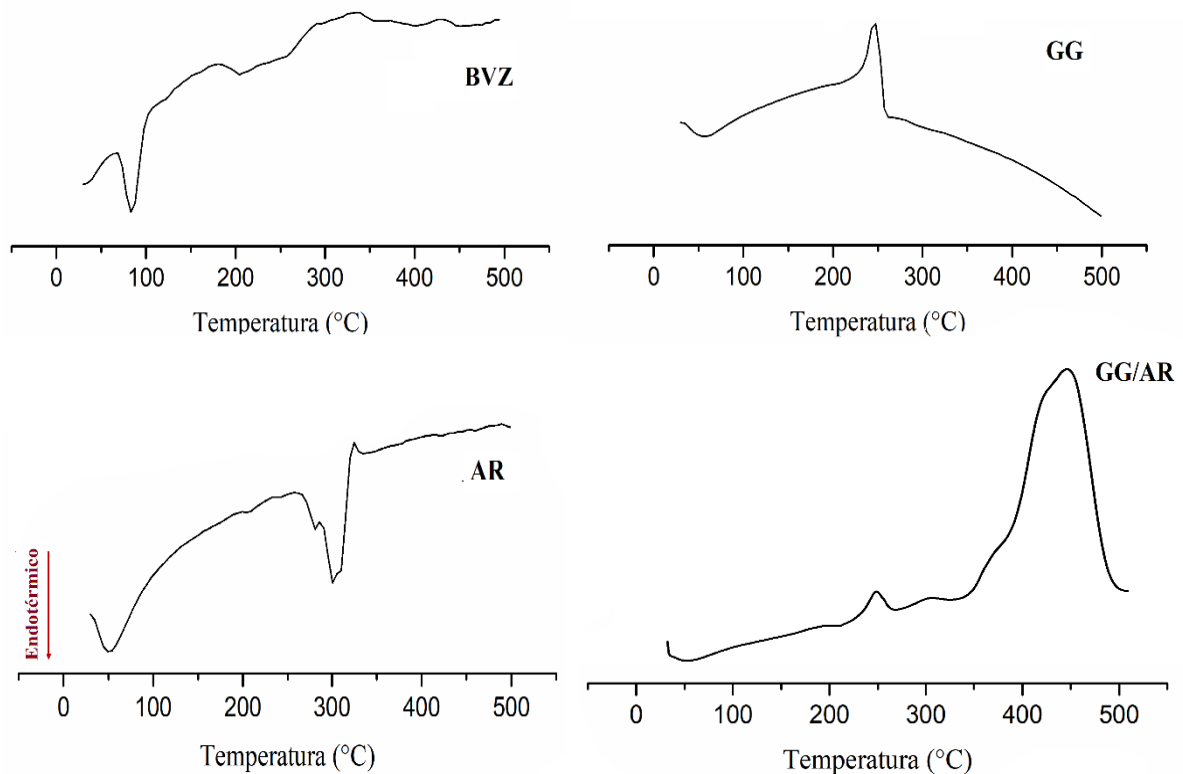


Figura 42. Curvas de DSC do BVZ, polímeros isolados (AR e GG) e mistura GG/AR.

Tabela 19. Parâmetros calorimétricos da GG, AR, BVZ e das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.

Amostras	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔH (J/g)
AR	39,62	54,46	84,33	-72,69
	273,71	283,53	289,19	-209,39
	294,29	302,04	318,07	-121,51
GG	38,57	61,34	101,07	-125,42
	234,55	247,48	257,17	256,21
GG/AR	40,51	60,72	91,30	-64,56
	232,15	245,96	260,62	99,38
	379,41	441,77	482,19	4818,52
BVZ	75,06	88,43	100,92	-97,05
NP1	92,18	99,67	106,88	-158,46
	269,21	287,27	316,32	-151,56
NP1R1	88,55	97,38	106,02	-250,99
	257,86	280,83	310,36	-155,09
NP1R2	91,34	96,7	102,68	-24,89
	261,67	287,31	313,77	-88,81
NP2	88,75	97,19	104,47	-271,81
	260,46	277,74	319,64	-268,09
NP2R1	39,31	92,55	114,58	-93,35
	283,24	299,04	313,57	-156,62
NP2R2	89,75	96,64	103,43	-49,96
	252,52	275,88	298,43	-115,9
NP3	90,3	99,42	107,72	-146,17
	263,48	280,58	302,22	-163,53
NP3R1	87,81	95,29	101,93	-46,3
	254,29	278,86	304,87	-128,29
NP3R2	88,84	95,3	102,85	-24,46
	254,23	277,2	294,11	-132,52

A curva de DSC do BVZ exibiu uma transição endotérmica com um pico alargado em aproximadamente em 88,43 °C, típico de anticorpos monoclonais (SIGNORELLO et al., 2014). Esse evento endotérmico é atribuído à desnaturação da proteína, devido à quebra das ligações

de hidrogênio e das ligações covalentes do tipo dissulfeto responsáveis pela manutenção estrutural da proteína.

O BVZ possui uma elevada complexidade estrutural e apresenta em seus domínios duas cadeias pesadas idênticas (Fab) e duas cadeias leves idênticas (Fc), os quais originam duas transições térmicas, em aproximadamente 70 °C e 80 °C, relacionadas aos desdobramentos de ambos fragmentos Fab e Fc, respectivamente (ZHANG et al., 2012). De acordo com Matsuura e colaboradores (2015), um pico endotérmico relativo a desnaturação ocorre em temperaturas próximas a 80 °C, pois nessa condição, as proteínas geralmente começam a agregar e o processo de desnaturação ocorre irreversivelmente.

O pico amplo observado na curva do BVZ (Figura 42), provavelmente, deve ter englobado os dois eventos térmicos relatados acima, os quais foram exibidos na curva do nanoDSC (item 5.6.3).

Para o AR, a curva de DSC (Figura 42) apresentou uma transição endotérmica trifásica, em 54,46 °C, 283,53 °C e 302,04 °C (Tabela 19), valores próximos àqueles encontrados por Cardoso (2014) para o amido retrogradado. O primeiro pico em ~54,46 °C está relacionado com a desorção da água quimicamente ligada. O segundo e terceiro picos verificados em 283,53 °C e 301,88 °C, estão relacionados a decomposição do amido. Segundo Liu e colaboradores (2005), acima de 260 °C ocorre a fusão dos cristalitos, homogeneamente dispersos na matriz polimérica, e as cadeias de amilose e amilopectina e de glicose são quebradas levando a decomposição do amido através da carbonização.

A curva de DSC da GG (Figura 42) exibiu um pico endotérmico alargado em 61,34 °C e outro exotérmico em 247,48 °C, relacionados ao processo de desidratação e de desintegração das cadeias poliméricas (degradação) (CARDOSO, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2014), respectivamente, ambos valores semelhantes àqueles encontrado por Xu e colaboradores (2007), em estudos com filmes a base de GG e konjak glucomanana.

Para a mistura GG/AR observou-se três transições térmicas, uma endotérmica e duas exotérmicas. O primeiro evento apresentou-se como um pico endotérmico alargado em 60,72 °C, valor intermediário àqueles encontrados para GG e AR isolados (Tabela 19) e que estão relacionados com a desorção de água e um pico exotérmico em 245,96 °C, correspondente a degradação da GG. Esses dois picos foram mantidos em relação aos polímeros isolados, porém verificou-se uma redução na intensidade desses picos, que pode ser um indicativo da interação entre GG e AR. Excepcionalmente, verificou-se um largo pico exotérmico em 441,77 °C com ΔH de 4818,52 J/g. Esse comportamento, evidencia que prováveis interações devem ocorrer

entre GG e AR resultando em uma rede mais forte e estável, onde uma maior energia térmica foi necessária para romper as ligações formadas. Além disso, segundo Zhu e colaboradores (2018), em estudos sobre a estrutura, degradação térmica e comportamento de combustão de diferentes tipos de amido, verificaram que na faixa de temperatura de 260 – 450 °C primeiro ocorre a despolicimerização da cadeia polimérica, seguida pela extensa degradação térmica dos anéis de glicose, com liberação de grande quantidade de gases e formação de carvão, já que o amido é um carboidrato constituído principalmente de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas.

As curvas de DSC obtidas para as nanopartículas estão apresentadas nas Figura 43 e os valores dos parâmetros calorimétricos estão listados na Tabela 19.

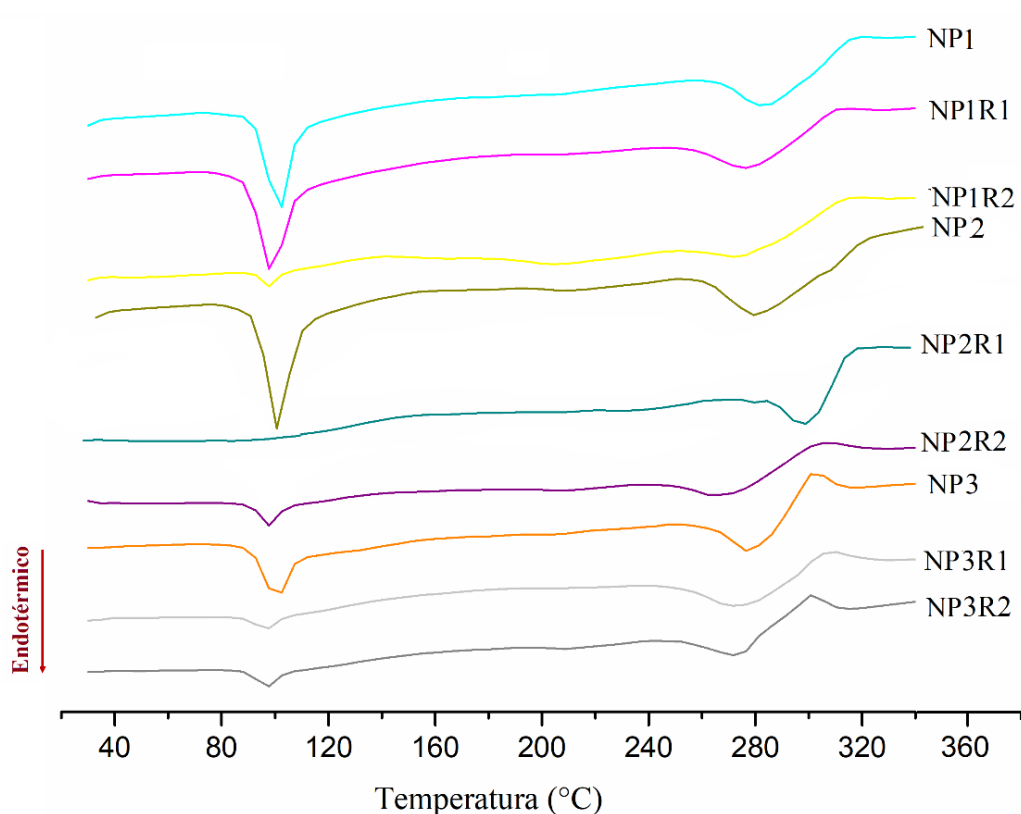


Figura 43. Curva de DSC das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.

As curvas de DSC das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas (Figura 43) o primeiro evento endotérmico observado apresentou valores de T_{onset} variando entre 87,81 °C – 107,72 °C, com T_{peak} de ~100 °C (Tabela 19), temperaturas maiores em relação ao fármaco (Tabela 19) (Figura 42). Esse comportamento deve estar relacionado ao processo desnaturação da proteína, que ocorreu em temperaturas maiores, em relação ao BVZ isolado (Figura 42).

Esses resultados corroboram os estudos de nanoDSC (item 5.6.3), que demonstrou que o desenovelamento da proteína ocorreu em temperatura próxima a 100°C.

Apesar de verificar um leve aumento da temperatura de degradação dos sistemas, para as amostras reticuladas, com exceção de NP1R1, verificou-se que na maior concentração de reticulante e, principalmente, de BVZ (NP1R2, NP2R2, NP3R1 e NP3R2), menores valores de ΔH (Tabela 19) foram encontrados (24,46 – 49,96 J/g), razão pela qual não se deve sugerir que houve um aumento de estabilidade térmica nessas amostras. Em contrapartida, as amostras não reticuladas NP1, NP2 e NP3 apresentaram maiores valores de ΔH , variando entre 146,17 – 271,81 J/g, o que mostra mais uma vez a existência de uma forte interação fármaco-polímero, o qual foi necessária maior energia térmica para romper as ligações. A capacidade dos materiais poliméricos, principalmente das blendas poliméricas em aumentar a estabilidade térmica já foi demonstrada em outros estudos por nosso grupo de pesquisa (CARDOSO, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2014).

As diferenças de intensidades dos picos entre todas as amostras estudadas podem estar relacionadas à desnaturação de moléculas de BVZ que estão adsorvidas à superfície das nanopartículas, o que explica a redução dos picos nas nanopartículas reticuladas, em que as moléculas do BVZ estão aprisionadas no interior da estrutura.

O segundo evento endotérmico cujos valores T_{onset} e T_{peak} apresentaram-se na faixa de 252,52 °C á 283,24 °C e de 275,88 °C á 299,04 °C, respectivamente (Tabela 19), demonstrou que as nanopartículas degradaram em temperaturas próximas àquelas verificadas para os materiais poliméricos isolados.

De maneira geral, observou-se que a intensidade dos picos em aproximadamente 100 °C foram maiores para nanopartículas não reticuladas (NP1, NP2 e NP3). Em contrapartida, para as nanopartículas reticuladas, com exceção de NP1R1, houve uma redução na intensidade dos picos. Esse comportamento é coerente, uma vez que a reticulação das nanopartículas deve promover um aprisionamento mais efetivo das moléculas do fármaco no interior das nanopartículas, como pode ser observado pelos dados de EI%.

5.6.5 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

A Termogravimetria é considerada uma técnica extremamente importante para análises de sistemas poliméricos. Amplamente utilizada no campo farmacêutico, a TG é uma técnica que baseia-se na medida da variação de massa (perda ou ganho) da amostra em função da

temperatura, a partir do aquecimento programado, fornecendo informações da temperatura de decomposição, desidratação, oxidação, combustão de materiais, bem como interações entre fármaco e excipientes (GALWEY; CRAIG, 2007; STORPIRTIS et al., 2000). Para auxiliar a visualização dos eventos, foram calculadas as derivadas a partir da TG, o qual expressa a primeira derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt). As curvas da DTG permitem obter informações sobre os picos cujas áreas são proporcionais a variação de massa da amostra tornando mais fácil a visualização dos eventos (OLIVEIRA et al., 2011).

As curvas de TG/DTG obtidas para o BVZ, polímeros isolados (GG e AR), mistura GG/AR, nanopartículas reticuladas e não-reticuladas estão apresentadas nas Figura 44 e os dados obtidos pela análise estão apresentados na Tabela 20.

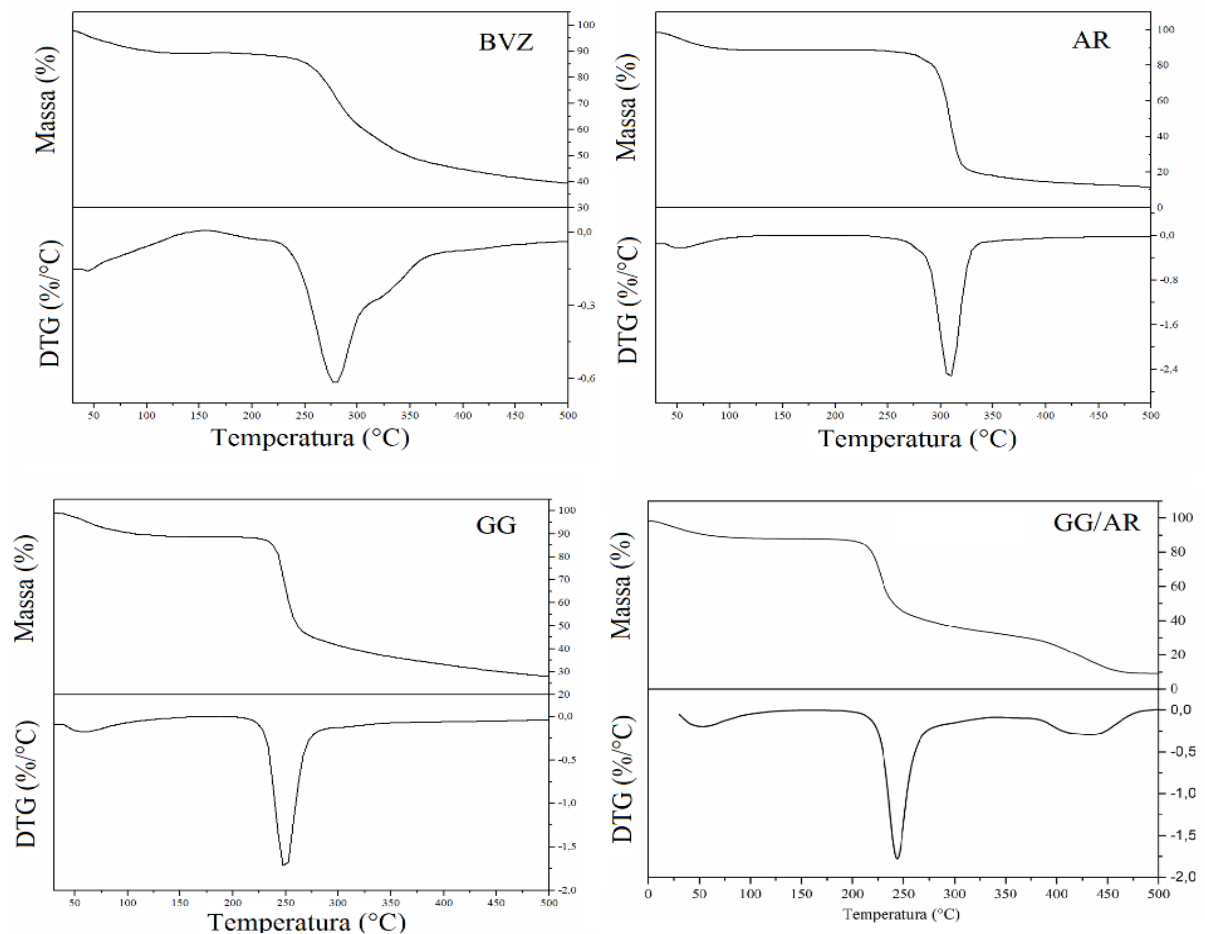


Figura 44: Curvas de TG/DTG do BVZ, polímeros isolados e mistura polimérica GG/AR. polieletrólitos.

Tabela 20. Percentual de perda de massa dos polímeros isolados (GG e AR), mistura GG/AR (1:1), BVZ, nanopartículas reticulada e não reticuladas

Amostras	Primeiro evento		Segundo evento		DTG (°C)	%Massa residual
	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)		
AR	43,82 - 73,60	9,17	242,57 - 260,30	73,94	250,86	16,89
GG	45,67 - 88,06	9,72	299,14 - 321,81	53,99	311,34	36,29
GG/AR	44,86 - 77,41	8,93	235,37 - 257,94	54,15	245,45	9,33
BVZ	40,10 - 58,45	6,45	258,82 - 320,22	47,08	280,81	46,47
NP1	92,94 - 110,36	5,66	279,03 - 314,99	65,06	297,86	29,28
NP1R1	92,07 - 117,81	8,81	272,43 - 312,34	67,59	292,45	23,60
NP1R2	70,60 - 123,91	6,51	268,95 - 316,81	68,60	293,81	24,89
NP2	57,50 - 113,06	7,42	285,67 - 312,94	69,45	300,57	23,13
NP2R1	92,71 - 114,59	8,57	272,89 - 313,73	61,22	293,82	30,21
NP2R2	79,16 - 121,45	7,32	266,83 - 310,78	63,74	289,24	28,94
NP3	93,16 - 130,45	6,86	276,31 - 305,74	65,50	291,50	27,64
NP3R1	85,12 - 123,38	6,87	271,03 - 308,08	64,16	290,64	28,97
NP3R2	91,23 - 123,77	6,28	266,55 - 308,75	63,61	289,04	30,11

A curva de TG do BVZ (Figura 44) apresenta uma região de perda de massa de 6,45 % entre 40,10 °C e 58,45 °C, relativo à evaporação da água. Um segundo evento de perda de massa de 47,09 % ocorreu entre 258,82 °C e 320,22 °C, com T_{peak} de DTG em 280,81 °C, atribuído à decomposição do fármaco. Esses valores foram próximos àqueles relatados por Gomes (PAULA et al., 2011), em estudos com implantes intraoculares a base de poliuretano biodegradável contendo BVZ.

A curva de TG da GG (Figura 44) exibiu dois eventos de perdas de massa, sendo o primeiro entre 45,67 °C e 88,06 °C, exibindo uma perda de massa de 9,72 % atribuída ao processo de desidratação, e o segundo entre 242,57 °C e 260,30 °C, com 53,99 % de perda de massa, relacionada à ruptura das ligações entre as cadeias polimérica e degradação, confirmado pelo pico exotérmico em 247,48 °C na curva de DSC da GG (Figura 44). O pico da curva de DTG da GG ocorreu em 250,86 °C. Esses valores foram semelhantes àqueles encontrados por Cardoso (2014) em estudos com micropartículas de GG e AR.

Para o AR, a primeira região de perda de massa de 9,17 %, referente a desidratação, ocorreu entre 43,82 °C e 73,60 °C, enquanto o evento entre 299,14 °C e 321,81 °C, com perda de massa de 73,93 % e pico de DTG em 311,34 °C, que corresponde à decomposição térmica do AR. Esses dados corroboram o comportamento observado na curva de DSC do AR (Figura 44) (item 5.6.4). Esses valores são próximos daqueles relatados por Varma, Panpalia e Jayaram (2014), Tita e colaboradores (2011) em estudos com sistemas sólidos contendo amido, e por Cardoso (2014), em estudos com micropartículas a base de GG e AR contendo cetoprofeno.

Para mistura GG/AR (1:1), o primeiro evento endotérmico observado na curva de TG ocorreu entre 44,86 e 77,41 °C, com uma perda de massa de 8,93 %, que corresponde ao processo desidratação. O segundo evento ocorreu entre 235,37 e 257,94 °C, com um percentual de perda de massa de 54,15 %. A DTG exibiu um pico endotérmico em aproximadamente 250 °C, sendo provavelmente relacionado com a degradação da mistura polimérica. O terceiro evento (dados não apresentados na Tabela 20) entre 403,26 °C – 461,76 °C corresponde a perda de massa de 20,75 % e pode ser devido a despolimerização e carbonização das moléculas do AR, que não interagiu com a GG. Esse comportamento corrobora com os dados observados na análise por DSC, em que um largo pico exotérmico relativo a degradação foi exibido acima de 350 °C (item 5.6.4).

Considerando que a temperatura de degradação/carbonização da GG ocorre em 257,17 °C e do AR em valores acima de 280 °C, esperava-se que pelo menos dois eventos de perda de massa fossem observados nas curvas de TG/DTG das amostras; entretanto, um único evento

com perda de massa maior de 50% foi verificado em 250 °C evidenciando a presença de interações entre os materiais poliméricos. Assim, de maneira geral, os resultados evidenciaram o aumento da estabilidade térmica das nanopartículas em relação a proteína isolada.

Para as nanopartículas reticuladas e não-reticuladas (Figura 45), de maneira geral, verificou-se duas regiões de perda de massa, a primeira com uma discreta perda de massa entre 5,66 % e 8,81 %, na faixa de temperatura de 57,5 °C à 130,45 °C, correspondente a desidratação dos materiais devido ao processo de aquecimento (CARDOSO, 2014b; PREZOTTI et al., 2014; SOARES et al., 2013; STORPIRTIS et al., 2000) ou ainda devido a degradação da proteína que ocorre nessa mesma região. Segundo Dudhani e Kosaraju (2010), as perdas de massa relativas a desidratação justifica-se pela elevada afinidade que os polissacarídeos têm pela água e, portanto, facilidade de hidratação.

O segundo e principal estágio de perda de massa das amostras, relacionado a decomposição, ocorreu em uma única etapa no intervalo entre 266,55 °C e 316,81 °C, apresentando um pico de DTG em 300 °C, com perdas de massa na faixa de 63,26 % a 69,45 %. Conforme verificado nas curvas de DSC das amostras (item 5.6.4) (Figura 45) esse evento refere-se a degradação das nanopartículas.

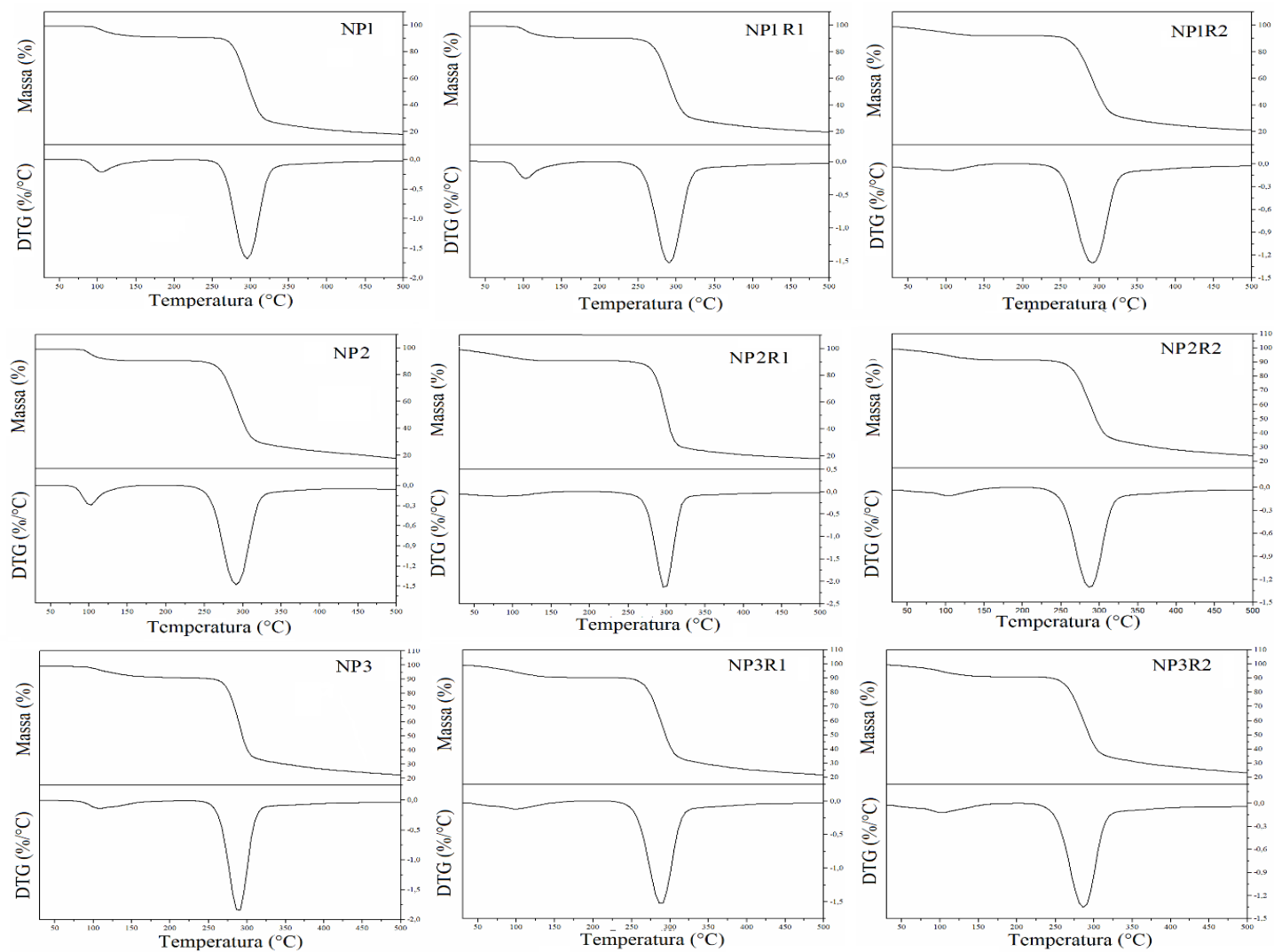


Figura 45. Curvas de TG/DTG das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.

Em estudos recentes em nosso grupo de pesquisa, as análises de TG/DTG de micropartículas de GG e AR revelaram uma redução de 150 °C na temperatura de degradação das micropartículas em relação aos polímeros isolados (300 °C) (CARDOSO, 2014). Nesse estudo, a perda de massa relacionada a degradação das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas ocorreu em temperaturas mais elevadas (aproximadamente 300 °C), 150 °C acima da temperatura verificada para micropartículas citadas. Esse comportamento, indica a capacidade dos sistemas desenvolvidos em aumentar a estabilidade térmica.

Esse comportamento pode ser devido a possibilidade de formação de uma estrutura com maior grau de cristalinidade, após a complexação polieletrólítica e reticulação iônica com $AlCl_3$, em que maior energia térmica foi necessária para romper a estrutura formada.

Os valores de massa residual (%) das nanopartículas após o processo de aquecimento (500°C) apresentaram-se entre 23,13 % e 30,21 %. A massa residual do BVZ, GG e AR foi de 46,47%, 36,29% e 16,89%, respectivamente. Esses resíduos são subprodutos inorgânicos remanescentes da degradação térmica dos materiais poliméricos que constituem os sistemas.

5.7 Avaliação das propriedades reológicas e mucoadesivas

O termo “reologia” é a ciência que estuda o fluxo e deformação dos materiais. A técnica baseia-se na análise comportamental dos materiais frente à aplicação de uma força ou deformação (SCHRAMM, 2006).

A caracterização do comportamento viscoelástico pode ser realizada através da determinação dos módulos de armazenamento (G'), o qual representa a energia de tensão temporariamente armazenada durante a análise (resposta sólida), e de perda (G''), que se refere a energia dissipada para iniciar o fluxo, a qual é irreversivelmente perdida sendo transformada em calor de cisalhamento (resposta líquida) (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; JONES, 1999; SCHRAMM, 2006). Esses parâmetros podem ser determinados em função da frequência (Hz), possibilitando a obtenção de informações estruturais de polímeros, bem como de suas misturas (SCOTT, 2000; SCHRAMM, 2006).

As propriedades mecânicas do muco gástrico são fundamentais para o desempenho de suas propriedades protetoras e são determinadas, principalmente, pelas glicoproteínas mucinas que compõe a matriz do muco (SELLERS et al., 1988).

As interações mucina-mucina que levam a agregação e gelatinização são fortemente influenciadas pelo pH, já que a mudança da conformação espiral randômica em pH neutro para

globular em pH ácido é esperada (BANSIL; TURNER, 2006; CELLI et al., 2007).

As mucinas são constituídas por um núcleo proteico com domínios interdispersos ricos em prolina, serina e treonina ou cisteína (domínios PTS), além de cadeias laterais de polissacarídeos que constituem 80% da sua massa molecular. Essas glicoproteínas formam grandes agregados poliméricos com massa molar de até 20 MDa, através de ligações dissulfeto (BANSIL; TURNER, 2006).

A interação entre polímeros e mucina, através de interpenetração de cadeias e/ou interações supramoleculares influencia diretamente nas propriedades reológicas dos materiais poliméricos (THIRAWONG; KENNEDY; SRIAMORNSAK, 2008).

Neste estudo, o comportamento reológico de dispersões aquosas de mucina e das misturas nanopartículas/mucina foi avaliado através de ensaios oscilatórios dinâmicos, em pH 1,2 e pH 6,8, os quais foram considerados biorrelevantes, de acordo com gradiente de pH do TGI. O módulo de interação ($\Delta G'$) foi calculado, a fim de se estabelecer uma análise comparativa das propriedades mucoadesivas das nanopartículas (reticuladas e não-reticuladas) avaliadas.

5.7.1 Testes oscilatórios dinâmicos

A região de viscoelasticidade linear (RVL) das dispersões estudadas variou entre 0,01 – 1 Pa em pH 1,2 e entre 0,003 – 0,02 Pa no pH 6,8 (Figura 46), indicando a formação de estruturas fracas (OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017).

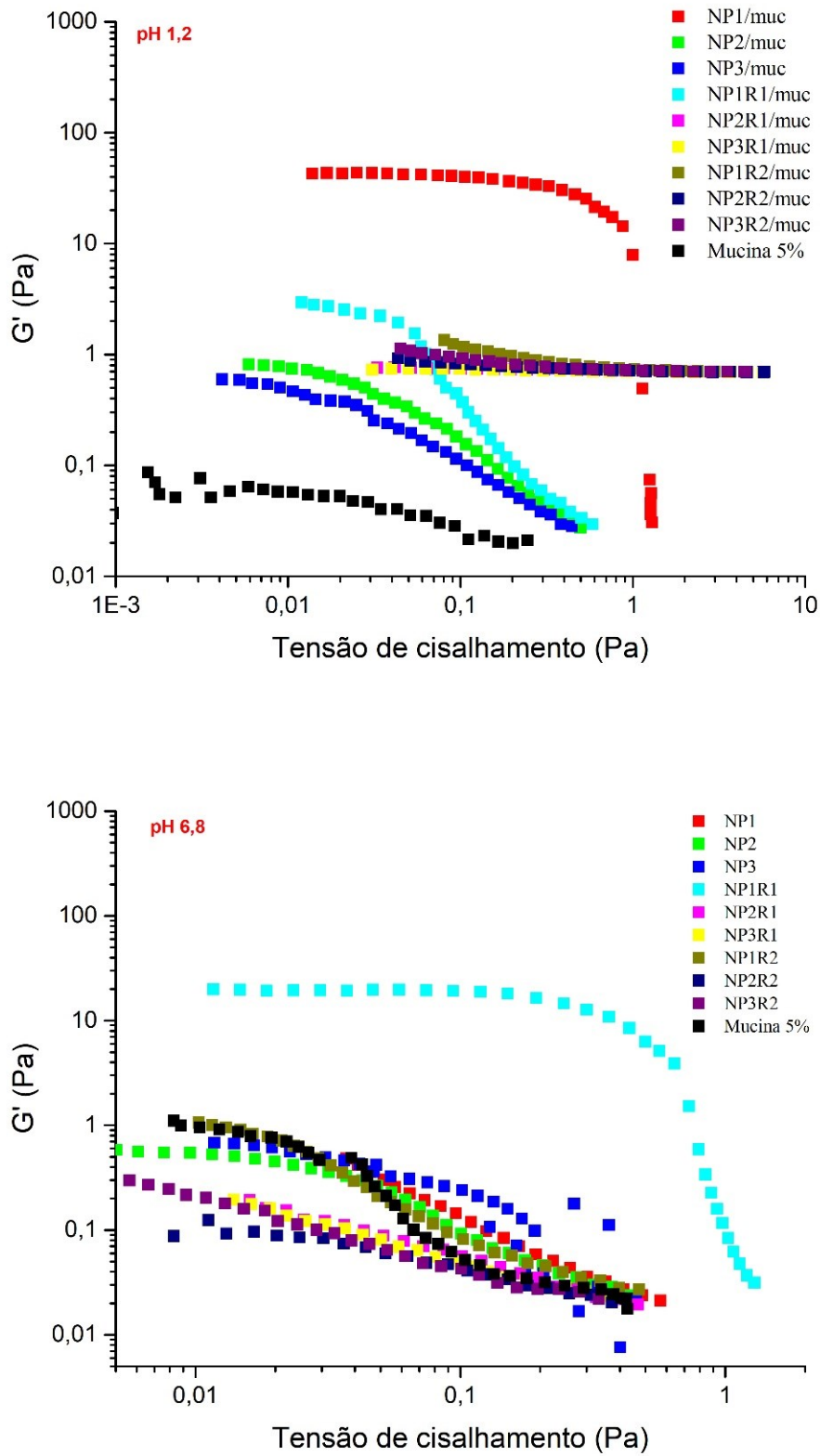


Figura 46: Espectros da varredura de tensão da mucina e das misturas nanopartículas/mucina em pH 1,2 e pH 6,8.

Nos espectros mecânicos, em pH 1,2, verificou-se que todas as misturas nanopartículas/mucina (nanopartículas reticuladas e não reticuladas), exibiram valores de G' superiores à G'' (1,3 – 8 vezes) (Tabela 21), (Figura 47), demonstrando o comportamento predominantemente elástico dessas amostras em ambiente ácido (GRASSI et al., 2006; WALTER, 1997). Além disso, os valores de G' e G'' para uma determinada frequência foram sempre maiores em relação à mucina (Tabela 21), o que mostra que a incorporação das nanopartículas às dispersões de mucina levou a modificações estruturais na dispersão de mucina tornando a rede estruturalmente mais rígida. Esse comportamento deve contribuir para a redução nas taxas de liberação do BVZ em meio ácido, uma vez que essa estrutura mais rígida deve impor uma maior resistência à difusão do fármaco para meio de dissolução.

Tabela 21. Valores de stress crítico, G' e G'' do teste oscilatório da mucina e das misturas nanopartículas/mucina (frequência 1 Hz).

Amostras	pH 1,2		pH 6,8	
	G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
Mucina	0,0311	0,0538	0,0354	0,0461
NP1/mucina	4,0601	1,3283	0,9514	0,6791
NP1R1/mucina	1,2128	0,6606	3,9779	0,9079
NP1R2/mucina	0,7625	0,2077	6,9813	0,9024
NP2/mucina	0,6592	0,5270	0,7968	0,5941
NP2R1/mucina	0,7298	0,0945	0,2373	0,3036
NP2R2/mucina	0,7384	0,1218	0,1853	0,2254
NP3/mucina	0,3493	0,2769	2,6871	0,6424
NP3R1/mucina	0,8438	0,1602	0,2908	0,2999
NP3R2/mucina	0,7303	0,1115	0,4844	0,2537

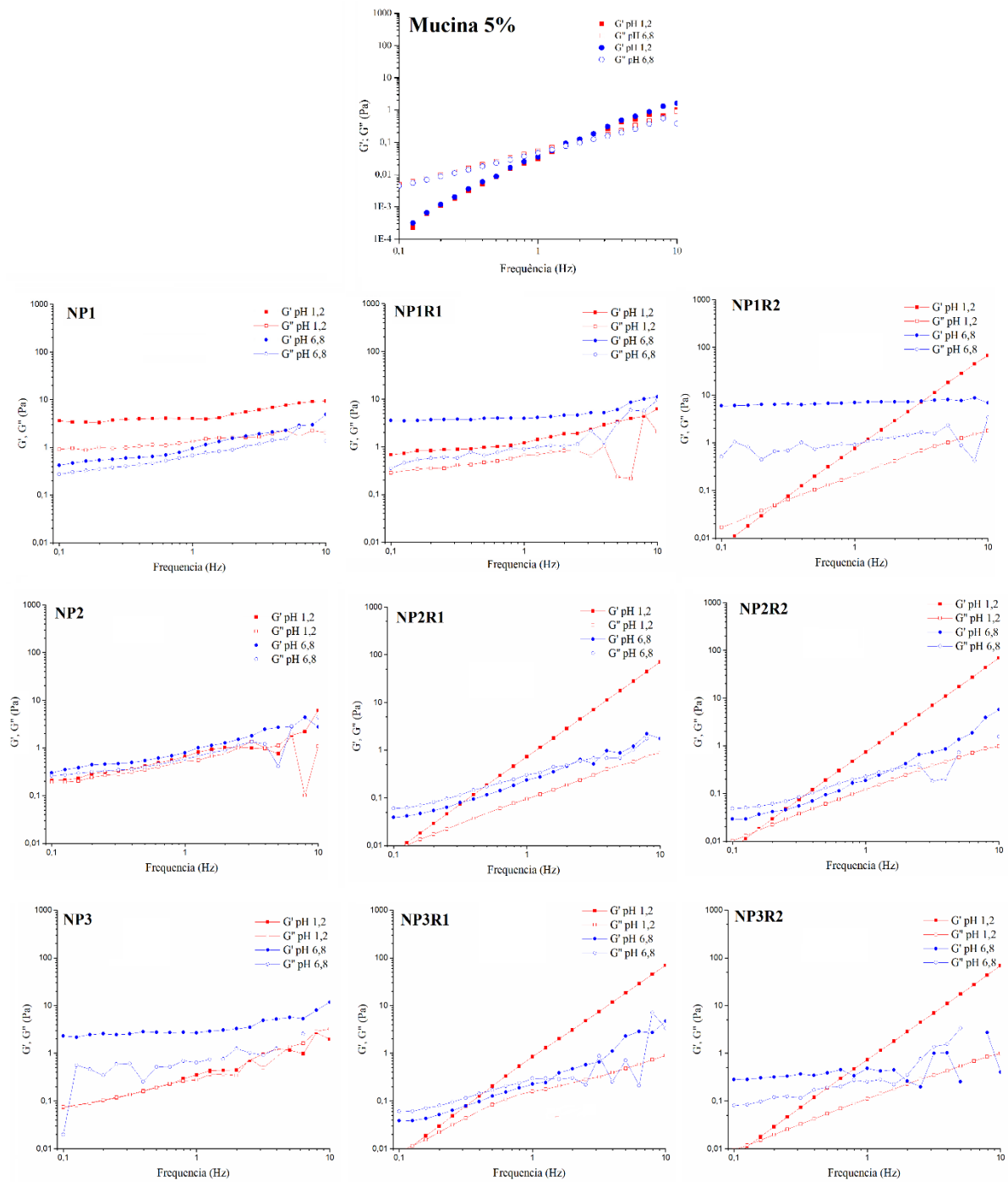


Figura 47. Espectros de varredura de frequência da mucina e das misturas nanopartículas/mucina em pH 1,2 e 6,8.

Os espectros mecânicos da mucina (Figura 47) evidenciaram o comportamento altamente dependente da frequência de ambos os módulos G' e G'' , de forma que G'' foi maior que G' em baixas frequências e G' maior que G'' em frequência mais elevadas, com *cross-over* próximo a 1 Hz. A ocorrência do *cross-over* com sobreposição dos valores de G' aos valores de G'' em frequências mais elevadas é característica de soluções semidiluídas de polímeros altamente entrelaçados (MOHAMMADIFAR et al., 2006). Dessa forma, podemos inferir que para ambos os valores de pH, uma estrutura fraca, característica de um gel físico deve ter sido formada, o que se confirma com seus reduzidos valores de G' (11 - 133 vezes menores) em relação às demais dispersões.

Estudos realizados por Maleiki e co-autores (2008) demonstraram que em pH próximo a 1,2, a mucina gástrica de porco encontra-se protonada, de forma que complexos de cadeias poliméricas compactadas com cargas positivas em sua superfície podem ser formados pela associação dos domínios hidrofóbicos não glicosilados e entrelaçamentos físicos, os quais sofrem o efeito repulsivo das cargas positivas de superfície, resultando em uma interação fraca. Quando em valores mais elevados de pH, próximos a 6,8, a mucina deve apresentar densidade de carga negativa elevada, o que levam à expansão de rede polimérica por repulsão das cadeias, o que também desfavorece as interações intercadeias, resultando na formação de uma rede fraca.

Para as amostras não reticuladas (Figura 47), nos espectros de NP1/mucina, G' manteve-se superior a G'' (3 vezes) (Tabela 21), durante toda faixa de frequência, caracterizando o comportamento predominantemente elástico dessa amostra. Além disso, observou-se que em pH 1,2, G' e G'' foram praticamente independentes da frequência até a frequência de 1,5 Hz, indicando que a interação entre nanopartículas e a mucina deve ter levado a formação de um gel físico, através de interações fracas (interações van der Waals, dipolo-dipolo, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio), porém mais forte e estável em relação a mucina. Segundo Khondkar e colaboradores (2007), esse tipo de géis possuem propriedades reológicas intermediárias entre soluções e géis fortes, em que sob baixas tensões de deformação, os géis fracos apresentam um comportamento mecânico de géis fortes, porém com o aumento da deformação as redes tridimensionais passam por uma quebra progressiva de seus aglomerados maiores em estruturas menores, reduzindo seu caráter elástico. Em pH 1,2 os valores de G' foram bastante superiores (4,2 vezes maior) aos valores de G' em pH 6,8, indicando que naquele pH as interações nanopartículas/mucina foram mais fortes.

Nos espectros mecânicos de NP2/mucina e NP3/mucina, os valores de G' e G''

praticamente se sobrepõe, em ambos os valores de pH, demonstrando o equilíbrio entre os componentes viscosos e elásticos, e os valores de G' foram relativamente dependentes da frequência, indicando a formação de estruturas mais fracas. Os valores de G' em pH 1,2 foram significativamente inferiores (6,6 a 11,7 vezes menores) em relação àqueles apresentados pela NP1, indicando que o aumento da concentração de fármaco desfavoreceu a interação nanopartícula/mucina nesse pH. Particularmente para NP3, os valores de G' em pH 6,8 foram superiores aos valores em pH 1,2, indicando que as interações nanopartícula/mucina foram mais efetivas em pH 6,8, quando o BVZ se apresenta em sua máxima concentração.

Entre as amostras reticuladas, o espectro mecânico de NP1R1/mucina, mostrou que G' permaneceu acima de G'' (aproximadamente 2 vezes), em toda a faixa de frequência, indicando o comportamento predominantemente elástico dessa amostra. Os valores de G' maiores e menos dependentes da frequência em pH 6,8 do que em pH 1,2, indicam que ao contrário do observado para as nanopartículas não reticuladas, estruturas mais fortes e estáveis foram formadas em pH 6,8, o que deve estar relacionado com interações mais fortes entre nanopartículas e mucina, as quais são representativas do processo de mucoadesão. Esse comportamento deve promover um contato mais íntimo do fármaco com a mucosa intestinal, por períodos de tempos prolongados, favorecendo o aumento da concentração local do fármaco e, conseqüentemente, um efeito terapêutico prolongado.

Para NP1R2/mucina, observa-se que os valores de G' em pH 6,8 foram superiores (~7 vezes) aos respectivos valores em pH 1,2. Além disso, deve-se observar que em pH 6,8, o módulo G' foi praticamente independente da frequência, enquanto em pH 1,2 os valores foram altamente dependentes da frequência, com ocorrência de *cross-over* em baixa frequência. Tal comportamento evidencia que as interações nanopartículas/mucina foram desfavorecidas em pH ácido, enquanto a formação de estruturas mais fortes e estáveis em pH 6,8 deve estar relacionado com a forte interação nanopartículas/mucina.

Para as demais amostras reticuladas (NP2R1/mucina, NP2R2/mucina, NP3R1/mucina e NP3R2/mucina), em pH 1,2, G' foi maior que G'' e quase toda a faixa de frequência estudada, caracterizando o comportamento predominantemente elástico das amostras. No entanto, os valores foram altamente dependentes da frequência, caracterizando a formação estruturas de gel fraco, com reduzida estabilidade mecânica.

Em pH 6,8, as amostras NP2R1/mucina, NP2R2/mucina e NP3R1/mucina exibiram comportamento viscoso (G'' maior que G') abaixo de 1 Hz, seguido por um *cross-over* onde G' torna-se maior que G'' (3 – 8 vezes), sendo ambos dependentes da frequência, exibindo um

comportamento predominantemente elástico em elevadas frequências. Essa mudança do comportamento viscoso em baixa frequência para o comportamento elástico em alta frequência é característica de soluções semidiluídas de cadeias poliméricas altamente enoveladas. A amostra NP3R2/mucina apresentou G' superior a G'' na maior parte da faixa de frequência estudadas, indicando a formação de estruturas mais fortes que para as amostras NP2R1/mucina, NP2R2/mucina e NP3R1/mucina.

O conjunto de comportamentos observados demonstra que para as nanopartículas não reticuladas, de modo geral, o aumento das concentrações de fármaco promoveu a formação de estruturas mais fracas. Para a nanopartículas reticuladas observou-se que o aumento da concentração de agente reticulante (Al^{3+}), particularmente para a mínima concentração de fármaco, promoveu a formação de estruturas mais fracas, o que indica a redução das interações nanopartículas/mucina no meio ácido. Para a mínima concentração de reticulante, o aumento da concentração de fármaco também promoveu a formação de estruturas mais fracas.

Deve-se considerar que em pH 1,2, ambos polímeros GG, AR e mucina devem apresentar densidade de carga negativa reduzida, em função da protonação de seus grupamentos funcionais. Assim, uma rede mais compacta é formada, já que a repulsão eletrostática entre as cadeias é reduzida. No entanto, para as amostras não reticuladas, as cadeias devem apresentar mobilidade suficiente para que efetivas interações sejam estabelecidas através da interpenetração das cadeias dos polímeros que compõem a nanoestrutura, bem como por outras subsequentes interações supramoleculares, as quais são atribuídas ao processo de mucoadesão.

Quando essas estruturas que já apresentam certo grau de compactação são adicionalmente reticuladas, as cadeias podem perder a mobilidade estrutural necessária para que as citadas interações sejam efetivamente estabelecidas, já que a interpenetração das cadeias e a disponibilidade dos grupamentos funcionais, bem como de eventuais domínios hidrofóbicos das estruturas poliméricas envolvidas, pode ser restrita. Tais fatores devem desfavorecer a formação de uma rede mais forte e estável. Da mesma forma, o aumento da concentração do BVZ na nanoestrutura pode resultar na formação de uma estrutura mais compacta e rígida que afeta as possibilidades de interação com a mucina, como observado para a mínima concentração de reticulante.

Em pH 6,8, o elevado grau de ionização dos grupamentos funcionais dos respectivos polímeros (GG, AR e mucina), naturalmente, permite a formação de uma estrutura mais dilatada e frouxa, com elevada densidade de carga negativa. Dessa forma, apenas na máxima concentração de BVZ observou-se um expressivo aumento de G' para as amostras não

reticuladas, o qual está relacionado com a formação de estruturas mais fortes, devido a maior interação nanopartículas/mucina. Para as nanoestruturas reticuladas, somente observa-se um expressivo aumento de G' quando o agente reticulante está em sua máxima concentração, quando o fármaco está em sua concentração mais baixa. Estruturas mais fortes foram originadas na presença da menor concentração de BVZ, para a máxima concentração de reticulante, provavelmente porque o aumento da concentração de fármaco aliado ao aumento da concentração de reticulação desfavoreceu as interações nanopartícula/mucina, já que nesse pH, os polímeros apresentam elevada densidade de carga negativa o que deve favorecer as interações intercadeias.

Como tendência geral de comportamento, observa-se que o processo de reticulação e o aumento da concentração do BVZ desfavoreceram as interações nanopartículas/mucina em pH 1,2, sem prejudicar as referidas interações em pH 6,8, perfil favorável ao objetivo pretendido.

5.7.2 Cálculo do módulo de interação

O aumento na resposta reológica da dispersão de mucina quando sistemas poliméricos são adicionados é designado como sinergismo reológico ou módulo de interação ($\Delta G'$) (CARVALHO et al., 2010; CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002; HASSAN; GALLO, 1990). Esse módulo é utilizado como uma medida da força da interação mucoadesiva entre grupos funcionais dos nanopartículas e mucina. Para um sistema ser considerado mucoadesivo, a resposta reológica, no caso o módulo de armazenamento (G' e $\Delta G'$) da mistura com a mucina deve ser maior que o da mucina isolada (HASSAN; GALLO, 1990).

Diversos autores têm sugerido que o $\Delta G'$ entre sistemas poliméricos e mucina pode ser considerado um módulo *in vitro* para determinação das propriedades mucoadesivas de diversos materiais, sendo um modelo muito bem estabelecido (BONACUCINA; MARTELLI; PALMIERI, 2004; CAMELLA et al., 1994; CAMELLA; ROSSI; BONFERONI, 1999; HÄGERSTRÖM; PAULSSON; EDSMAN, 2000; HASSAN; GALLO, 1990; MADSEN; EBERTH; SMART, 1998; MORTAZAVI; CARPENTER; SMART, 1992; ROSSI et al., 2001).

Considerando que as medidas reológicas das dispersões de nanopartículas (5 mg/mL) foram inviáveis, já que seus valores de viscosidade foram negligenciáveis, gerando dados reológicos inconsistentes, no presente trabalho, para o cálculo do módulo de interação, o termo G'_{nano} foi excluído da Equação 11. Os valores dos módulos de interação das nanopartículas

estudadas estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Módulo de interação ($\Delta G'$) das misturas nanopartículas/mucina (Frequência 1 Hz).

Amostras	$\Delta G'$ (Pa)	
	pH 1,2	pH 6,8
Mucina	-	-
NP1	4,035 \pm 1,796	0,917 \pm 0,383
NP1R1	1,187 \pm 0,654	3,944 \pm 1,434
NP1R2	0,737 \pm 0,004	1,295 \pm 0,103
NP2	0,634 \pm 0,273	0,763 \pm 0,280
NP2R1	0,704 \pm 0,006	0,203 \pm 0,031
NP2R2	0,713 \pm 0,003	0,184 \pm 0,085
NP3	0,324 \pm 0,127	3,465 \pm 0,464
NP3R1	0,818 \pm 0,214	0,266 \pm 0,159
NP3R2	0,705 \pm 0,003	0,553 \pm 0,262

De maneira geral, os valores de $\Delta G'$ foram sempre positivos em ambos valores de pH (Tabela 22), evidenciando modificações estruturais em função da interação nanopartículas-mucina.

Em pH 1,2, entre todas as amostras, reticuladas e não reticuladas, o maior valor de $\Delta G'$ foi verificado para NP1/mucina ($p < 0.05$), enquanto em pH 6,8, os maiores valores de $\Delta G'$ foram exibidos por NP1R1/mucina, NP1R2/mucina e NP3/mucina ($p < 0.05$) corroborando os comportamentos demonstrado nos testes oscilatórios dinâmicos.

5.8 Estudo de dissolução do BVZ

5.8.1 Ensaio de liberação in vitro do BVZ

O ensaio de liberação representa uma importante ferramenta para predizer o controle espacial e/ou temporal das taxas de liberação de fármacos. Basicamente, as taxas de liberação do fármaco dependem de alguns fatores como a solubilidade do fármaco; desorção de fármacos adsorvidos à superfície do sistema; difusão, erosão ou degradação da matriz polimérica e/ou a combinação desses processos (BONI et al., 2018; BONI et al., 2016; CARBINATTO et al.,

2014; CARBINATTO et al., 2016; CARDOSO, 2014b; MENEGUIN et al., 2018; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; SILVA; et al., 2018; PREZOTTI et al., 2014; RECIFE et al., 2017). O estudo da liberação *in vitro* do BVZ foi realizado para as amostras NP1R1, NP1R2 e NP3, consideradas mais mucoadesivas (item 5.8) e com NP1 para avaliar a influência da concentração de BVZ na liberação. Os perfis de liberação estão apresentados nas Figuras 47 e 48. A influência da reticulação, bem como das concentrações de fármaco e reticulante foram avaliadas.

Os perfis de liberação *in vitro* do BVZ a partir das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas, de modo geral, demonstraram uma redução significativa das taxas de liberação, em relação ao BVZ livre, em ambos os meios de dissolução (Figuras 47 e 48), demonstrando a habilidade dos sistemas em modular as taxas de liberação do fármaco. Levando em consideração a elevada massa molar dos polímeros, em relação ao BVZ, é provável que maior quantidade de grupos funcionais estejam disponíveis para interagir fortemente com o fármaco e, dessa forma, levar a formação de estruturas mais compactas, com elevado nível de organização estrutural, que restringiu a difusão do fármaco para meio de dissolução.

Durante todo ensaio em meio ácido (pH 1,2) verificou-se que as taxas de liberação do BVZ a partir das nanopartículas foi significativamente reduzida em relação ao BVZ livre ($p < 0,05$) (Figura 48), com valores de redução de 55,57-70,18 %.

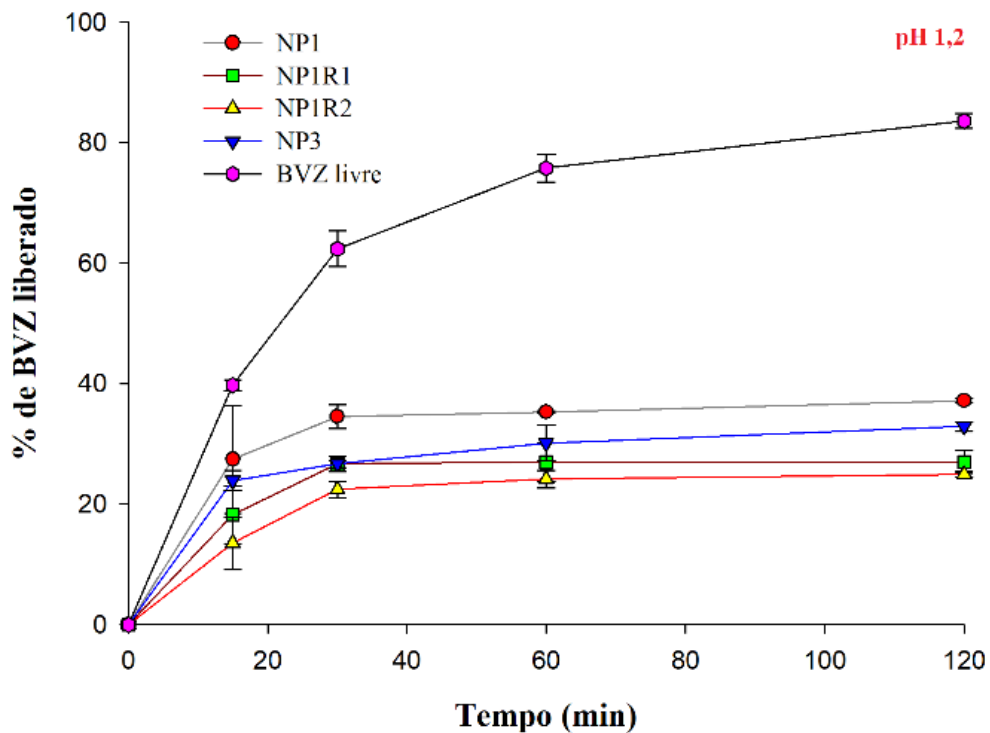


Figura 48. Perfil de liberação do BVZ a partir das nanopartículas de GG/AR (reticuladas e não reticuladas) em HCl pH 1,2 (0-120 min).

De maneira geral, ao término do ensaio (120 minutos) as taxas de liberação do BVZ incorporado as nanopartículas foram menores que 37 % (Tabela 23), enquanto para BVZ livre foi aproximadamente 84 %. Considerando que o BVZ possui carga positiva em valores de pH abaixo do seu ponto isolétrico ($pI = 8,3$), é possível que em pH 1,2 interações fortes entre fármaco e polímeros tornou as estruturas mais fortes e compactadas, em que as cadeias poliméricas, provavelmente, apresentam menor mobilidade impondo maior resistência física a difusão do BVZ. Esse comportamento também foi verificado por Souza e colaboradores (2017), em estudos com nanopartículas de PLGA contendo BVZ.

Tabela 23. Percentual de BVZ liberado em meio ácido (pH 1,2) e em tampão fosfato (pH 6,8) (n=3).

Amostras	% de BVZ liberado								
	15 min		30 min		60 min		120 min		240 min
	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8	pH 6,8
BVZ livre	39,75 ± 0,89	21,70 ± 0,71	62,35 ± 2,97	62,36 ± 1,12	75,79 ± 2,32	64,34 ± 0,68	83,60 ± 1,23	65,22 ± 0,68	66,74 ± 0,31
NP1	27,44 ± 8,98	17,65 ± 10,74	34,52 ± 1,96	19,64 ± 0,83	35,29 ± 0,16	22,63 ± 1,55	37,18 ± 0,41	23,53 ± 4,26	26,43 ± 0,53
NP1R1	18,22 ± 4,80	12,02 ± 6,75	26,67 ± 1,25	15,50 ± 7,49	26,93 ± 3,16	18,11 ± 4,71	27,00 ± 1,88	17,94 ± 2,40	19,80 ± 9,14
NP1R2	13,51 ± 4,35	16,73 ± 7,54	22,44 ± 1,33	15,73 ± 6,18	24,15 ± 1,45	20,25 ± 2,64	24,93 ± 0,43	16,13 ± 3,34	26,91 ± 2,38
NP3	23,90 ± 1,63	12,00 ± 5,62	26,69 ± 0,62	18,75 ± 1,78	30,14 ± 2,99	19,97 ± 0,13	32,89 ± 0,80	21,94 ± 0,90	30,41 ± 4,02

As menores taxas de liberação foram verificadas para as nanopartículas reticuladas, (NP1R1 e NP1R2) (Tabela 23) ($p < 0,05$), independente da concentração de reticulante ($p < 0,05$). Após 120 min de ensaio, os percentuais de redução dessas amostras em relação ao BVZ, foram de 67,7 % e 70,18 % para NP1R1 e NP1R2, respectivamente. Esse resultado é coerente, uma vez que a reticulação com o $AlCl_3$ pode favorecer a formação de uma estrutura mais compacta, promovendo o efetivo aprisionamento do BVZ na rede polimérica, que provavelmente dificultou a difusão do fármaco através da matriz polimérica.

Um *burst* de liberação de 13-28 % foi observado para todas as amostras (Figura 48) (Tabela 23) nos primeiros 15 minutos de ensaio em meio ácido, que pode ser atribuído a desorção do BVZ adsorvido a superfície das nanopartículas (BANERJEE et al., 2017; LI et al., 2005). A região de platô observada após 30 minutos provavelmente se deve a uma possível reorganização estrutural da rede que promoveu um maior controle das taxas de liberação do fármaco em meio ácido.

Analisando as taxas de liberação em função das diferentes concentrações de BVZ (0,15 mg/mL e 0,35 mg/mL) e de reticulante (0,015 mg/mL e 0,02 mg/mL), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ($p > 0,05$) (Tabela 23).

Nos ensaios de liberação conduzidos em tampão fosfato pH 6.8 verificou-se que as nanopartículas exibiram reduzidas taxas de liberação (na faixa de 54,43-70,35 %), em relação ao BVZ livre, durante todo o ensaio ($p < 0,05$) (Figura 49). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 23).

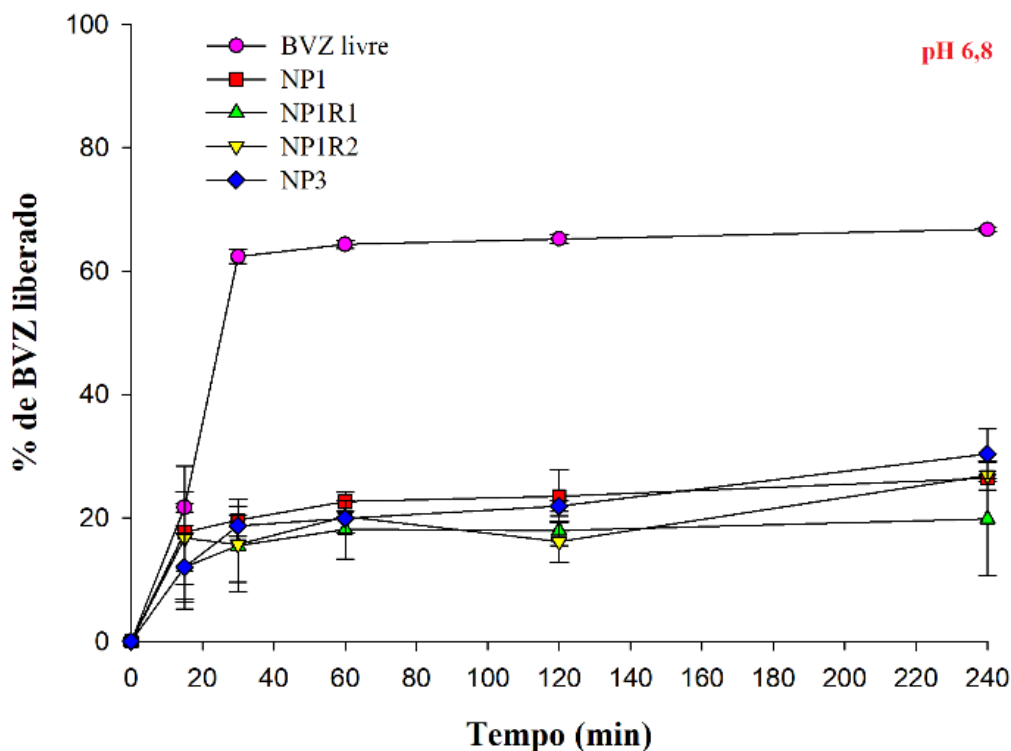


Figura 49. Perfil de liberação do BVZ a partir das nanopartículas de GG/AR (reticulada e não reticulada) em tampão fosfato pH 6,8 (0-240 min).

Em pH 6,8 a carga negativa dos grupos ionizados dos polímeros leva a repulsão das cadeias reduzindo as interações entre as cadeias poliméricas das partículas, favorecendo a entrada do meio de dissolução na nanopartícula e a difusão de moléculas de fármaco. Entretanto, possivelmente, a forte interação do fármaco com a mistura polimérica foi capaz de impor uma maior resistência à difusão do fármaco mantendo as taxas de liberação, ao final de 240 minutos, que foram inferiores a 31 %, comparadas ao BVZ, em que nos primeiros 15 minutos de ensaio, aproximadamente 60 % do fármaco já estava em solução.

O *burst* de liberação de 12-17,65 % observado para todas as amostras (Figura 49) (Tabela 23) pode ser atribuído a rápida ionização dos grupamentos ionizáveis (carboxílicos e hidroxilas) nos primeiros 15 minutos de ensaio, em pH 6,8. Além disso, conforme descrito anteriormente, esse comportamento também pode estar relacionado com a liberação do BVZ adsorvido a superfície da nanopartículas e a provável reorganização estrutural da rede, que resultou no controle das taxas de liberação.

De maneira geral, os dados mostram que tanto as nanopartículas reticuladas como as não reticuladas contribuíram para o controle das taxas de liberação do BVZ e demonstram o potencial dos nanosistemas para liberação de fármacos no cólon, e dessa forma possibilitar o tratamento local do câncer colorretal e de outras doenças do cólon.

5.8.2 Análise dos mecanismos de liberação “in vitro” do BVZ

Os modelos aplicados aos perfis de liberação de fármacos podem descrever matematicamente os mecanismos envolvidos no processo de liberação, como intumescimento, difusão do fármaco e erosão da matriz polimérica ou pela combinação de todos esses mecanismos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

Para avaliar os mecanismos envolvidos nos processos de liberação do BVZ a partir das nanopartículas, os modelos matemáticos de Baker-Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, primeira ordem, Hixson-Crowell e Weibull foram aplicados aos dados de liberação e os coeficientes de correlação ajustados (r^2) foram obtidos para os diferentes modelos estão apresentados na Tabelas 24 e 25.

Tabela 24. Coeficientes de correlação e parâmetros matemáticos dos dados de liberação do BVZ a partir das nanopartículas em HCl 0,1 M (pH 1,2), para os diferentes modelos matemáticos.

Modelos Matemáticos		Amostras			
		NP1	NP1R1	NP1R2	NP3
Baker-Lonsdale	k	0,0004	0,0002	0,0002	0,0003
	r^2	0,7159	0,7033	0,8129	0,7705
Higuchi	k	4,3378	3,2045	2,8241	3,6998
	r^2	0,6466	0,6567	0,7831	0,7203
Korsmeyer-Peppas	k	20,95	14,24	8,9838	15,83
	r^2	0,9848	0,9436	0,9298	0,9996
	n	0,1249	0,1455	0,2261	0,1542
Primeira ordem	k	0,0062	0,0040	0,0035	0,0014
	r^2	0,0564	0,0001	0,2337	0,1213
Hixson-Crowell	k	0,0018	0,0012	0,0011	0,0015
	r^2	0,0000	0,0000	0,1802	0,0421
Weibull	k	0,3000	<0,0001	<0,0001	0,1635
	r^2	0,7723	1,0000	1,000	0,9996
	b	2,0179	0,2320	0,3012	0,2804

Tabela 25. Coeficientes de correlação e parâmetros matemáticos dos dados de liberação do BVZ a partir das nanopartículas em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), para os diferentes modelos matemáticos.

Modelos Matemáticos		Amostras			
		NP1	NP1R1	NP1R2	NP3
Baker-Lonsdale	<i>k</i>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
	<i>r</i> ²	0,5477	0,5424	0,5924	0,8692
Higuchi	<i>k</i>	2,1904	1,6667	1,9385	2,1835
	<i>r</i> ²	0,4858	0,4971	0,5571	0,8423
Korsmeyer-Peppas	<i>k</i>	12,2582	8,9285	9,4164	6,1744
	<i>r</i> ²	0,9971	0,9755	0,8682	0,9674
	<i>n</i>	0,1403	0,1500	0,1698	0,2850
Primeira ordem	<i>k</i>	0,0019	0,0013	0,0016	0,0020
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,2768
Hixson-Crowell	<i>k</i>	0,0006	0,0004	0,0005	0,0006
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,2270
Weibull	<i>k</i>	0,1891	0,1667	0,1643	0,3229
	<i>r</i> ²	0,9950	0,9901	0,7266	0,9143
	<i>b</i>	0,2779	0,2357	0,2200	0,4434

De acordo com o valor de *r*², os modelos que melhor se correlacionaram com os dados de liberação das nanopartículas estudadas foram Korsmeyer-Peppas e Weibull.

O modelo de Korsmeyer-Peppas, o qual descreve a difusão do solvente e do fármaco a partir da rede estrutural, baseia-se na Lei da Potência e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo, de acordo com a Equação 14. Esse modelo deve ser aplicado aos primeiros 60% de liberação (KORSMEYER et al., 1983; PAPADOPOULOU et al., 2006; SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad \text{Equação 14}$$

Em que; *M_t* é a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo *t*; *M_∞* a quantidade total de fármaco liberado no tempo infinito; *K* é uma constante cinética e *n* é o expoente de liberação.

De acordo com o valor numérico do expoente de liberação n , o qual expressa o comportamento de liberação, quando $n = 0,43$, a liberação é governada pela difusão Fickiana (Caso I), de modo que velocidade de difusão das moléculas do fármaco através da rede polimérica segundo o gradiente de concentração é que controla a liberação do fármaco para o meio de eluição. Para valores $0,43 < n < 0,85$, o transporte é caracterizado como anômalo ou não-Fickiano, em que ambos os processos de difusão e intumescimento das cadeias poliméricas são determinantes para o processo de liberação. Quando $n \geq 0,85$, o mecanismo de liberação é classificado como transporte Caso II, cuja a liberação do fármaco é limitada pelos processos de intumescimento e relaxamento das cadeias poliméricas (BONI et al., 2018; BONI et al., 2016; CARBINATTO et al., 2012; CARBINATTO et al., 2014; CARBINATTO et al., 2016; COSTA; LOBO, 2001; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN et al., 2014; OLIVEIRA; FERRARI; et al., 2010; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; SILVA; et al., 2018; PREZOTTI et al., 2014; RECIFE et al., 2017; SIEPMANN; PEPPAS, 2012; SOARES et al., 2013).

Por outro lado, o modelo Weibull é considerado o mais versátil, pois pode ser ajustado a diferentes perfis de liberação e expressa a quantidade de fármaco acumulado no meio de dissolução (M) em um determinado tempo (t) (Equação 15) (COSTA; LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b) \quad \text{Equação 15}$$

Em que; M_t/M_∞ é a quantidade cumulativa de fármaco liberado no tempo t e no tempo infinito, respectivamente; a é o parâmetro de escala e b é o parâmetro de forma, sendo que de acordo com o valor numérico, caracteriza a curva de liberação como exponencial ($b = 1$), sigmóide ($b > 1$) e parabólica ($b < 1$) (COSTA; SOUZA, 2001).

Nesse modelo, o valor de b indica o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica (PAPADOPOULOU et al., 2006). Valores de $b \leq 0,75$ indicam que a liberação do fármaco é controlada pelo processo de difusão Fickiana (Caso I), enquanto quando $0,75 < b < 1$ a liberação é limitada pela difusão Fickiana associada ao Caso-II, e para $b > 1$ um mecanismo complexo envolvendo difusão, intumescimento e/ou erosão da matriz polimérica está envolvido no controle da liberação do fármaco (PAPADOPOULOU et al., 2006).

Em meio ácido (pH 1,2), para NP1R1 e NP1R2, o modelo que melhor se correlacionou com os dados de liberação do BVZ foi o de Weibull ($r^2=1,000$) (Tabela 24), com valores de b menores que 0,75, indicando que a liberação ocorreu através da difusão Fickiana (Caso I), em

que a liberação é controlada pela difusão das moléculas do fármaco segundo um gradiente de potencial químico (CURY et al., 2009a; SIEPMANN; PEPPAS, 2000).

Para NP1, os dados de liberação se correlacionaram melhor com Kosmeyer –Peppas com valor do expoente de liberação $n = 0,1249$, enquanto NP3 correlacionou com ambos modelos de Korsmeyer-Peppas e Weibull ($r_2 = 0,9996$) com valores de $n = 0,1542$ e $b = 0,2804$, respectivamente. Esses dados mostram que a liberação do fármaco a partir de NP1 e NP3 também ocorreu por difusão Fickiana (caso-I) (MENEGUIN et al., 2018).

Em tampão fosfato pH 6,8 (Tabela 25), para NP1 e NP1R1 os dados de liberação do BVZ correlacionaram muito bem com ambos modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas e Weibull, em que valores de n (sempre menores que 0,43) e do expoente b (menores que 0,75), indicaram o mecanismo de liberação por difusão Fickiana (caso-I). Da mesma forma, para NP1R2 e NP3, cujos dados de liberação correlacionaram com Korsmeyer-Peppas, os valores de n inferiores a 0,43, também os classifica como difusão Fickiana (caso-I).

Os valores reduzidos da constante cinética de liberação (k) tanto em pH 1,2 como no pH 6,8 demonstram que a velocidade de liberação do BVZ ocorreu de maneira controlada, corroborando os menores percentuais de BVZ liberado neste meio após 120 min de ensaio.

O conjunto de resultados obtido indica que apesar das diferentes concentrações de fármaco não terem influenciado no perfil de liberação do BVZ, a técnica de complexação polieletrólítica associada ou não a reticulação com o $AlCl_3$ utilizadas no preparo das nanopartículas contribuíram, de maneira significativa, para o controle das taxas de liberação do fármaco, que foram abaixo de 38 % e 31 % em pH 1,2 e pH 6,8, respectivamente.

5.9 Análise da estrutura secundária do BVZ por Dicroísmo Circular após a incubação em meio ácido (pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,8)

A técnica de dicroísmo circular (DC), uma importante ferramenta para o estudo da estrutura secundária de proteínas em solução, é um tipo de espectroscopia de absorção diferencial da luz polarizada circularmente a direita ou a esquerda por uma determinada substância. Quando esses dois componentes são absorvidos em diferentes extensões, a radiação resultante é chamada de polarização elíptica (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

O DC permite a determinação rápida da estrutura secundária de proteínas, já que estas macromoléculas são opticamente ativas (capazes de absorver luz polarizada circular), e através dos espectros obtidos é possível obter informações referentes às alterações nas estruturas α -

hélice e β -folha (GREENFIELD, 2006; KELLY et al., 2005; PATEL et al., 2015).

Uma das principais dificuldades enfrentadas na obtenção de sistemas para liberação oral de proteínas está relacionado à sua instabilidade físico-química frente às condições fisiológicas variáveis do TGI, em relação ao pH, atividade enzimática e tempo de trânsito. A integridade estrutural da proteína é de fundamental importância para garantir sua atividade farmacológica (MOELLER; JORGENSEN, 2008; SCHWEIZER; SCHÖNHAMMER; et al., 2013). Dessa forma, mudanças estruturais irreversíveis podem resultar em perda da atividade e, conseqüentemente, na toxicidade e imunogenicidade (PATEL et al., 2015).

O desenvolvimento de um sistema capaz de oferecer proteção contra a degradação/desnaturaçã do BVZ nas porções superiores do TGI representa um grande desafio.

O estudo de DC das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas foi realizado após a incubação dos sistemas em HCl 0,1 N (pH 1,2) e tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), pelo mesmo período de tempo utilizado nos ensaios de liberação in vitro (item 5.8.1), a fim de avaliar possíveis modificações na estrutura secundária e, conseqüentemente, na estabilidade estrutural do BVZ quando liberados das nanopartículas.

Os espectros de DC obtidos para o BVZ livre e nanopartículas, em pH 1,2 e pH 6,8, estão apresentados na Figura 50.

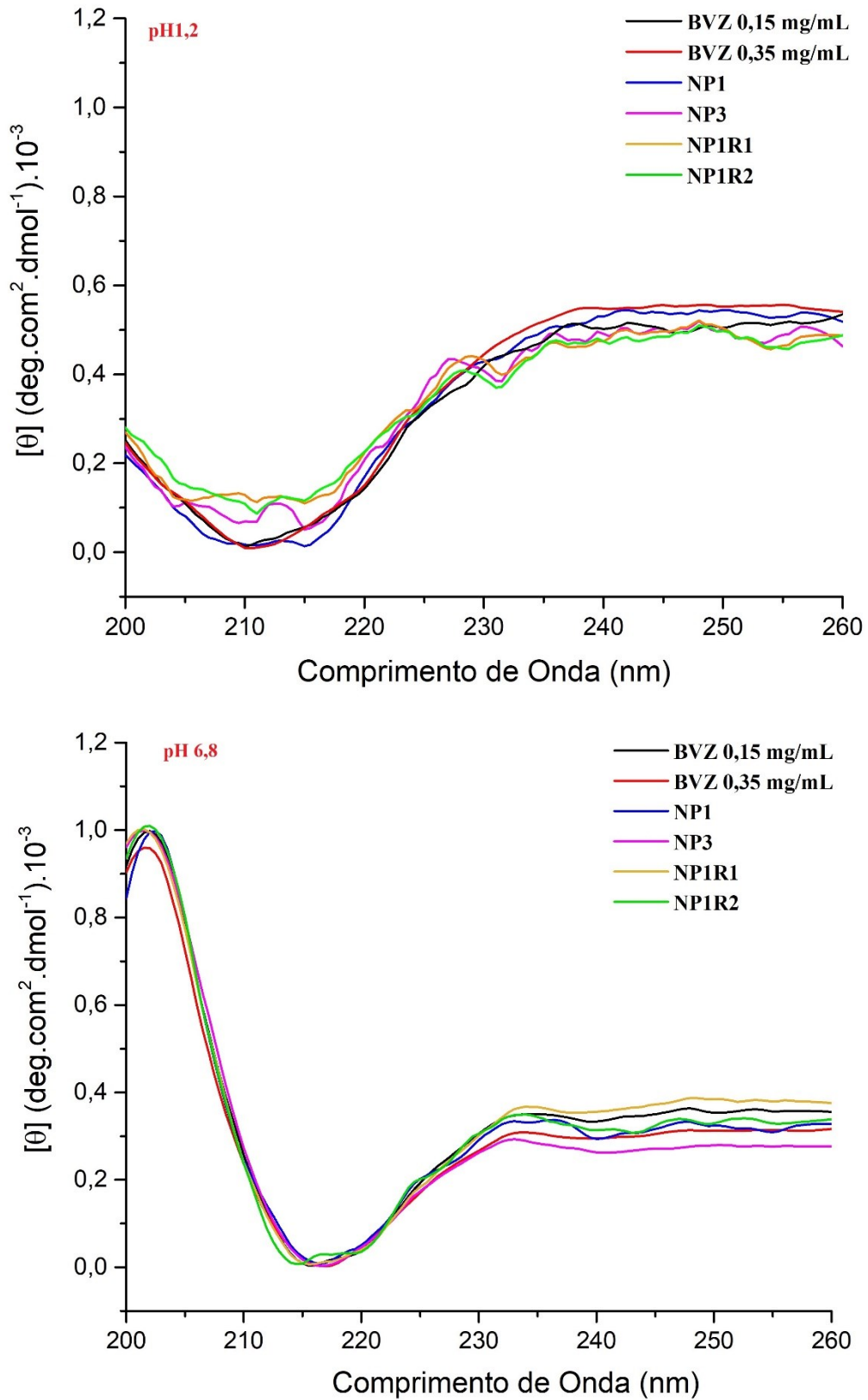


Figura 50: Espectro de dicroísmo circular do BVZ livre e após sua liberação das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas (A: pH 1,2 e B: pH 6,8).

A Figura 50 mostra que a estrutura secundária do BVZ é dominada por folhas- β , cuja banda negativa, característica de proteínas do tipo IgG, ocorre entre 210 nm e 220 nm (TYAGI et al., 2013).

Em pH 1,2, todas as amostras e BVZ livre, exibiram um desvio da elipticidade negativa dos espectros para comprimentos de ondas menores (*blue-shift*) (pico em \sim 210 nm) (Figura 50 A), em relação aos valores encontrados para proteína nativa (\sim 218 nm) (TYAGI et al., 2013). Esse comportamento sugere que o provável desenovelamento das proteínas levou a formação de uma estrutura aleatória (randômica).

Segundo KANMERT (2011) o *blue-shift* da banda negativa (\sim 218 nm) dos espectros de DC de proteínas do tipo IgG para valores entre 206 e 208 nm, em meio ácido, está relacionado a possibilidade da proteína ter sido desenoveladas em uma estrutura aleatória (randômica), sendo esse desenovelamento relativo a ionização dos aminoácidos das cadeias laterais (positivamente carregados), que levam a repulsão eletrostática das cadeias.

Ejima e colaboradores (2007), em estudos sobre do efeito do ambiente ácido na conformação estrutural, agregação e estabilidade de mAbs, demonstraram que em pH 2,7, os espectros de DC exibiram um *blue-shift*, com aumento na intensidade da banda negativa nesse valor de pH, indicando a perda da estabilidade da proteína e formação distintas da conformação nativa, provavelmente.

As diferenças na intensidade do sinal de elipticidade, verificadas nos espectros obtidos para valores de pH 1,2 podem ser atribuídas ao desenovelamento da proteína, o que é natural em razão da instabilidade físico-química do BVZ perante o ambiente ácido do estômago (ALBERTS et al., 2010).

Em pH 6,8 (Figura 50 B), os espectros de DC das nanopartículas demonstraram que a estrutura secundária do BVZ foi mantida, após a sua liberação das nanopartículas reticuladas e não-reticuladas, uma vez que a banda negativa entre 210 nm e 220 nm (com pico em \sim 218 nm) foi mantida. Comportamento semelhante foi reportado por Sousa e colaboradores (2017), em estudos com nanopartículas de PLGA contendo BVZ.

A deconvolução dos espectros foi apresentada somente para pH 6,8, uma vez que em pH 1,2 os resultados foram inconsistentes, provavelmente devido as modificações estruturais causadas pelo ambiente ácido.

Em tampão fosfato pH 6,8, os resultados da deconvolução revelaram que o BVZ é composto por 1,82 % de estrutura α -hélice, 43,82 % de folha β -antiparalela, 3,62 % de β -paralela, 17,42 % de volta- β e 33,32 % de randômica.

Os mesmos percentuais foram encontrados para as nanopartículas reticuladas e não-reticuladas, confirmando que a estrutura secundária do BVZ foi mantida após a incubação, o que sugere que as técnicas de complexação polieletrólítica e reticulação iônica permitiram que a integridade estrutural do BVZ fosse mantida mesmo após a sua liberação, corroborando os resultados das análises das estruturas secundária e terciária pelas técnicas de ATR-FTIR (item 5.6.1) e fluorescência (item 5.6.2).

A manutenção da conformação estrutural de proteínas é essencial para garantir sua atividade farmacológica. Pequenas modificações estruturais podem resultar na toxicidade, imunogenicidade e perda de sua atividade (PATEL et al., 2015). As alterações estruturais verificadas em pH 1,2 apontam para a importância das nanopartículas atribuírem proteção ao BVZ ao longo do TGI, para que ao atingir o cólon (pH 6,8) sejam capazes de liberar o fármaco garantindo o efeito terapêutico desejado.

5.10 Ensaios em células

Os estudos de viabilidade e permeabilidade celular utilizando-se como modelo as células Caco-2, células originadas de adenocarcinoma do cólon humano, se deve a sua capacidade de diferenciação em enterócitos, formando uma monocamada polarizada de células cilíndricas com características morfológicas e bioquímicas muito semelhantes ao epitélio intestina humano, com microvilosidades e junções paracelulares entre as células adjacentes e atividade enzimática de hidrolases peculiares do cólon (FERNANDES et al., 2015; SARMENTO et al., 2012)

Os ensaios de viabilidade e permeabilidade celular foram realizados com as amostras NP1R1, NP1R2 e NP3. Considerando que a única variável entre a amostra NP1 (150 µg/mL) e NP3 (350 µg/mL) é a concentração de BVZ, para o ensaio de viabilidade celular realizou-se a diluição de NP3 para atingir a concentração de BVZ de NP1.

5.10.1 Ensaio de viabilidade celular

Considerando a via oral de administração de fármacos e o cólon como sítio alvo, o estudo da viabilidade celular pelo ensaio de Alamar blue® (resazurina) foi realizado para determinar as concentrações que não perturbem a viabilidade das células Caco-2 nos ensaios de permeabilidade *in vitro*, e avaliar a biocompatibilidade dos polímeros, fármaco e nanopartículas. É importante ressaltar que para assegurar a completa biocompatibilidade outros

estudos (genotoxicidade, hematocompatibilidade, entre outros) são necessários, de acordo com a norma ISO 10993-1:2009.

Os resultados da viabilidade celular em 4 e 24 horas na linhagem Caco-2 para a mistura polimérica (GG/AR), nanopartículas reticuladas e não-reticuladas e BVZ livre estão apresentados na Figura 51. As células que não receberam nenhum tipo de tratamento foram consideradas como controle negativo (CN), e por isso apresentam viabilidade celular normalizada de 100%. O controle positivo (CP) foi composto por um agente potencialmente citotóxico (metilmetanosulfonato (MMS) 150 μ M) a fim de se demonstrar a redução da viabilidade celular (< 50 %).

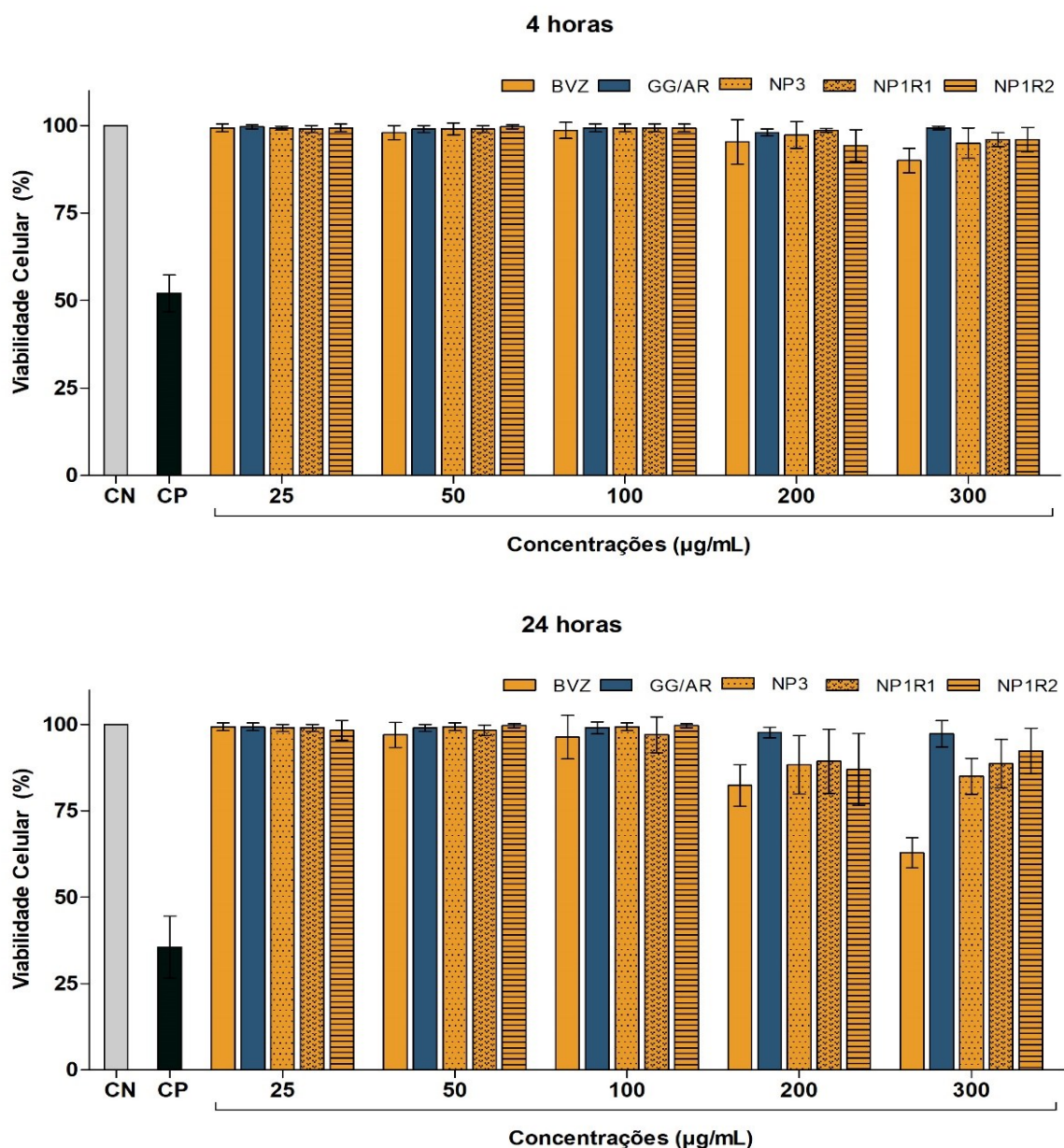


Figura 51. Viabilidade celular (%) na linhagem Caco-2, após 4h e 24h de incubação com BVZ livre, polímeros e nanopartículas reticuladas e não-reticuladas.

O ensaio revelou que após 4 h de incubação, a menor viabilidade das linhagens de células Caco-2 foi exibida pelo BVZ 300 µg/mL (90%) ($p < 0,05$). Para as demais amostras (mistura GG/AR e nanopartículas), a viabilidade celular foi de aproximadamente 100%, independente das concentrações testadas (Figura 51), sendo que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada entre as amostras ($p > 0,05$).

Nos ensaios após 24 h de incubação, observou-se uma discreta redução da viabilidade celular nas nanopartículas contendo 300 µg/mL de BVZ. Porém, tanto para essas amostras como para a mistura GG/AR, os percentuais de viabilidade celular foram superiores 85 %. Em contrapartida, o BVZ livre provocou uma redução da viabilidade celular nas concentrações de 200 µg/mL e 300 µg/mL (85% e 62 %, respectivamente), indicando que o tempo de contato prolongado com maiores concentrações de BVZ pode afetar a viabilidade das células Caco-2.

Os resultados obtidos após 4 e 24 horas de incubação revelaram que mistura polimérica (GG/AR) e as nanopartículas podem ser consideradas biocompatíveis e seguras. Por outro lado, o BVZ apresentou uma redução da viabilidade celular nas maiores concentrações testadas, a partir de 300 µg/mL após 24 horas de incubação.

Os resultados obtidos demonstraram que a presença do agente reticulante ($AlCl_3$) nas nanopartículas (NP1R1 e NP1R2), bem como a incorporação do BVZ nas nanopartículas pode ter contribuído para redução da citotoxicidade do fármaco. Provavelmente, devido ao controle da liberação do BVZ, um atributo favorável ao acúmulo de fármaco no local de ação e tratamento local de patologias intestinais.

5.10.2 Avaliação da integridade da monocamada de células Caco-2 por meio da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

A integridade da monocamada de células Caco-2 foi avaliada por meio da determinação da TEER, um parâmetro que permite inferir o quão unidas estão as junções paracelulares localizadas entre as células epiteliais (KRATZ, 2011; MENEGUIN et al., 2018; PRESS; DI GRANDI, 2008).

Os resultados de TEER obtidos aos 10°, 15° e 21° dias de cultivo estão apresentados na Figura 52.

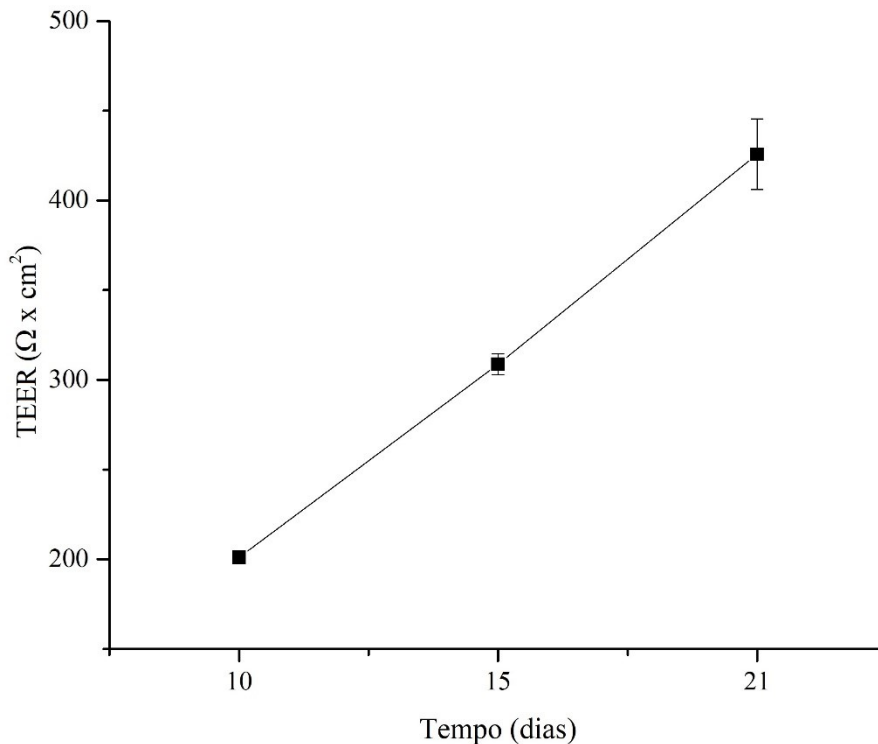


Figura 52. Medidas de TEER obtidos para as monocamadas de células Caco-2 aos 10, 15 e 21 dias de cultivo em meio DMEM com pH 7,4.

Os valores da TEER maiores que $400 \Omega/\text{cm}^2$, previamente ao início dos ensaios de permeabilidade (21^o) indicaram a integridade juncional das células Caco-2. Esse valor está acima daqueles reportados na literatura para as linhagens de células Caco-2, utilizadas neste estudo, em que os valores de RET devem ser superiores a $265 \Omega \times \text{cm}^2$, indicando a integridade juncional das células Caco-2 (FERNANDES et al., 2015; HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007; VOLPE et al., 2007).

5.10.3 Permeabilidade intestinal in vitro

A permeabilidade representa um parâmetro fundamental para prever a absorção de fármacos administrados pela via oral. A biodisponibilidade oral de fármacos pode ser afetada por fatores fisiológicos como as condições variáveis do TGI (pH, atividade enzimática e tempo de trânsito), pelas propriedades físico-químicas inerentes ao fármaco, como a solubilidade e taxas de dissolução, coeficiente de partição; pelas propriedades físico-químicas do sistema de liberação, como tamanho; concentração do fármaco e materiais que compõem o sistema (AMIDON et al., 1995; BALIMANE; HAN; CHONG, 2006; HIDALGO, 2001; KRATZ, 2011; PRESS; DI GRANDI, 2008).

A absorção de fármacos através do epitélio intestinal pode ocorrer por várias vias, dentre elas a via passiva, pela rota transcelular (através dos enterócitos) ou paracelular (através dos espaços intercelulares); por transporte ativo (mediado por carreadores); por difusão facilitada, através de transportadores de membrana (como a P-gp); por endocitose (mediada por receptor) (AMIDON et al., 1995; BALIMANE et al., 2006; HIDALGO, 2001; KRATZ, 2011; PRESS; DI GRANDI, 2008).

O modelo de monocamada de células Caco-2 tem sido amplamente explorado em nosso grupo de pesquisa como estratégia para avaliar os padrões de interação biológica de novos sistemas de liberação oral de fármacos (BONI et al., 2018; FERNANDES et al., 2015; MENEGUIN et al., 2018; PREZOTTI; BONI; FERREIRA; SILVA; et al., 2018; SARMENTO et al., 2012).

É importante ressaltar que a ausência ou redução da permeabilidade do fármaco é considerado um atributo favorável para o objetivo pretendido, uma vez que deve favorecer o acúmulo do fármaco no local de ação.

Para o ensaio de permeabilidade, as células foram cultivadas em suportes cuja base é permeável no sentido de permitir o livre acesso de íons e nutrientes, presentes no meio de cultivo (GONÇALVES, 2010; MORADI-AFRAPOLI et al., 2013), como mostra a Figura 53.

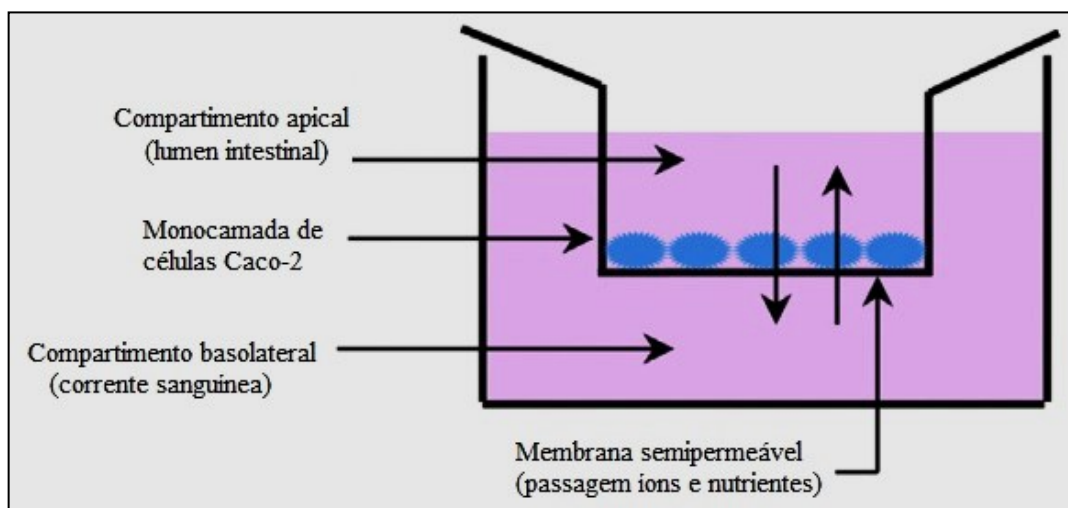


Figura 53. Esquema ilustrativo do ensaio de permeabilidade *in vitro*.
Fonte: Adaptado de MORADI-AFRAPOLI et al., 2013.

Neste estudo, a permeabilidade intestinal do BVZ livre e incorporado em nanopartículas poliméricas foi avaliado e os perfis de permeabilidade estão apresentados na Figura 54.

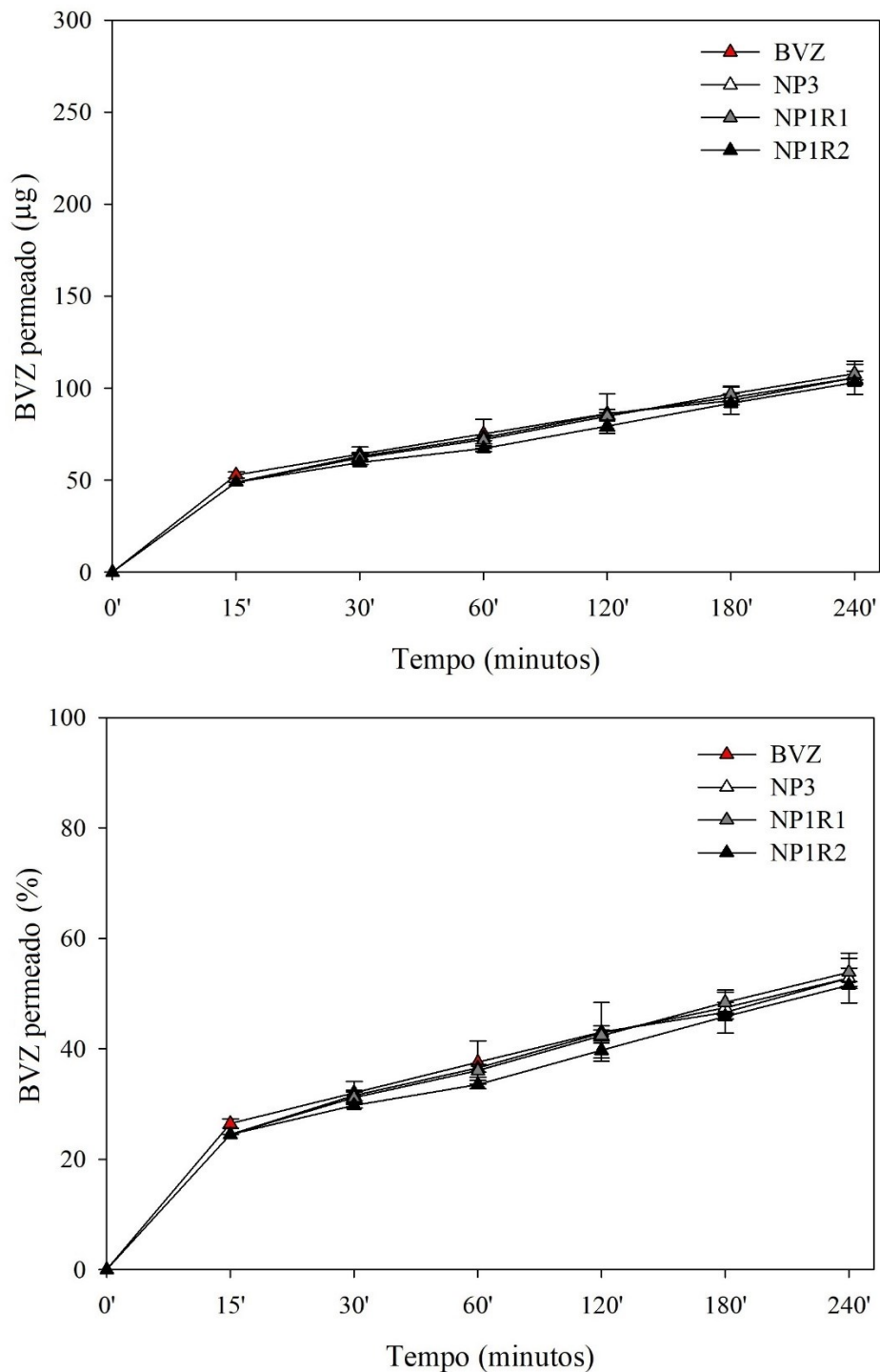


Figura 54. Percentual de permeabilidade do BVZ em monocamadas de células Caco-2 a partir das nanopartículas reticuladas e não reticulada.

Neste estudo, foram avaliadas as dispersões de fármaco livre (200 µg/mL) e 300 µg/mL para o BVZ incorporado as nanopartículas reticuladas e não-reticuladas. Tais concentrações foram selecionadas considerando os resultados de viabilidade celular, em que o fármaco livre (300 µg/mL) levou a redução de 65 % da viabilidade celular (item 5.10.1), e as reduzidas taxas

de liberação do BVZ incorporado às nanopartículas (< 31% em pH 6,8), garantindo a quantificação do BVZ, uma vez que o LQ foi de 25 µg/mL.

A permeabilidade do BVZ livre e incorporado às nanopartículas reticuladas ou não foi semelhante, durante os 240 minutos de ensaio. A permeabilidade foi inferior a 54 %, sendo que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre amostras ($p > 0,05$) (Figura 54). Os resultados mostram que mesmo após a nano-compartmentalização do BVZ, a permeabilidade manteve-se reduzida, assim como para o BVZ livre, o qual é classificado como um fármaco de baixa solubilidade (COSTA; SILVA, 2017; LIECHTY; PEPPAS, 2012; SILVA et al., 2002).

A baixa permeabilidade do fármaco associada ao efetivo controle das taxas de liberação do BVZ a partir das nanopartículas, como previamente demonstrado nos estudos de liberação, bem como suas potenciais propriedades mucoadesivas, devem contribuir para o acúmulo do fármaco no sítio de ação por um tempo prolongado, favorecendo a ação local do fármaco.

Os valores de P_{app} (Tabela 26) para todas as amostras foram menores que $0,5 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹, o que classifica o BVZ como fármaco de baixa permeabilidade, corroborando os dados de permeabilidade. Esses resultados são coerentes, uma vez que segundo Volpe e colaboradores (2007), fármacos de baixa permeabilidade apresentam valores de P_{app} menores que $5,0 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹.

Tabela 26. Valores de coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}).

Amostras	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm.s ⁻¹)
BVZ livre	0,42 ± 0,06
NP3	0,45 ± 0,01
NP1R1	0,48 ± 0,05
NP1R2	0,45 ± 0,01

Os resultados evidenciaram a capacidade dos sistemas em manter a baixa permeabilidade do BVZ, atributo favorável ao objetivo pretendido, que deve permitir o tratamento local do câncer colorretal e a redução dos efeitos adversos sistêmicos.

5.11 Avaliação da atividade anti-angiogênica do BVZ em membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha

A membrana corioalantóica de ovos de galinha (CAM, do inglês *ChorioAllantoic Membrane*) é um modelo experimental *in vivo* muito bem estabelecido no estudo do fenômeno da angiogênese, em função da sua natureza altamente vascularizada e a presença de proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colágeno tipo I e integrina $\alpha\beta_3$ (EGOSHI et al., 2015; LOKMAN et al., 2012; RIBATTI, 2014). Esse modelo tem sido amplamente explorado para avaliar a angiogênese e a progressão tumoral de diversos tipos de neoplasias malignas como câncer de cólon (SUBAUSTE et al., 2009), glioblastoma (STROJNIK et al., 2010), câncer de próstata (KOBAYASHI et al., 1998), leucemia (TAIZI et al., 2006) e osteosarcoma (BALKE et al., 2010).

A CAM é formada pela fusão entre o córion e o alantóide, entre o 3º (ED3) e 4º (ED4) dia do desenvolvimento embrionário (ED, do inglês *embryo development*) (EGOSHI et al., 2015; LOKMAN et al., 2012; RIBATTI, 2014), sendo a estrutura responsável pelas trocas gasosas entre o embrião e o ambiente.

A angiogênese na CAM ocorre entre o ED5 e o ED12 de incubação e passa por três fases de desenvolvimento. A fase inicial, entre os ED5 e ED7, caracterizada pela intensa proliferação endotelial com múltiplos brotamentos capilares que levam a formação de uma rede capilar primária (fase germinativa ou angiogênese por brotamento) (Figura 55). Nessa fase, a neovascularização é contínua promovendo o aumento na densidade microvascular. Entre o ED8 e ED12 (fase intermediária) a atividade proliferativa é reduzida (50%), os brotamentos capilares são cessados e novos vasos são formados a partir da angiogênese intussusceptiva (processo em que um capilar se divide longitudinalmente em dois a partir da formação de um septo) (Figura 55). Finalmente, a partir do ED13 dia (fase tardia), ocorre um aumento no comprimento e no diâmetro dos vasos formados, seguido pela diferenciação na morfologia arterial e venosa (DJONOV; GALLI; BURRI, 2000; MENEGHELLI, 2013).

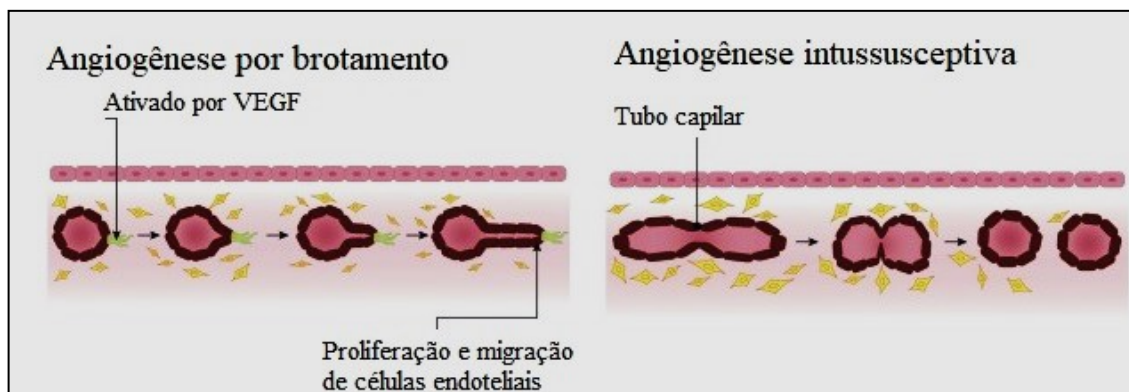


Figura 55. Processo de Angiogênese por brotamento e intussusceptiva.

Fonte: Adaptado de: DESESSO, 2017.

Dessa forma, a supressão da angiogênese embrionária entre os 5º e 10º dias de incubação evidencia a atividade anti-angiogênica de fármacos e/ou biomoléculas aplicados a esse modelo (NORRBY, 2006).

Considerado um modelo bastante simples, o modelo da CAM possui alta reprodutibilidade e baixo custo em relação aos modelos animais. Além disso, a realização do ensaio em sistema fechado garante a maior estabilidade de moléculas como peptídeos e proteínas, em relação aos modelos animais, contribuindo para a análise de potenciais fármacos anti-angiogênicos e anti-metastáticos (Egoshi et al., 2012).

Neste estudo, inicialmente, os ensaios foram realizados seguindo um protocolo pré-estabelecido pelo Grupo de Ótica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) na Universidade de São Paulo (USP), no qual a aplicação das amostras e aquisição das imagens seriam iniciadas no ED5 e repetidas nos ED8 e ED11. Porém, verificou-se que, após a aplicação das amostras no ED5, os embriões não sobreviveram e, de maneira geral, morreram no intervalo entre a primeira e a segunda aplicação (entre ED5 e ED8). Essa morte, provavelmente, pode estar relacionada com a destruição eficaz da rede vascular, impedindo a sobrevivência do embrião. Dessa forma, levando em consideração que no ED5 é o início da fase germinativa e, possivelmente, onde os brotamentos capilares estão mais imaturos, em relação ao ED6, um novo protocolo foi estabelecido (descrito no item 4.2.11), em que uma única aplicação foi realizada no ED6, seguida pela avaliação diária do desenvolvimento embrionário.

As imagens obtidas, com uma câmera USB Digital Microscope® (ADVANTGARDE, China), para grupo controle negativo (soro fisiológico (SF) 0,9 %), controle positivo (BVZ livre em solução aquosa) (0,15 mg/mL ou 0,35 mg/mL), dispersão de GG/AR (1:1, v/v; 0,35 mg/mL) e para as todas as nanopartículas contendo BVZ (NP1, NP1R1, NP1R2 e NP3) estão apresentadas na Figura 56.

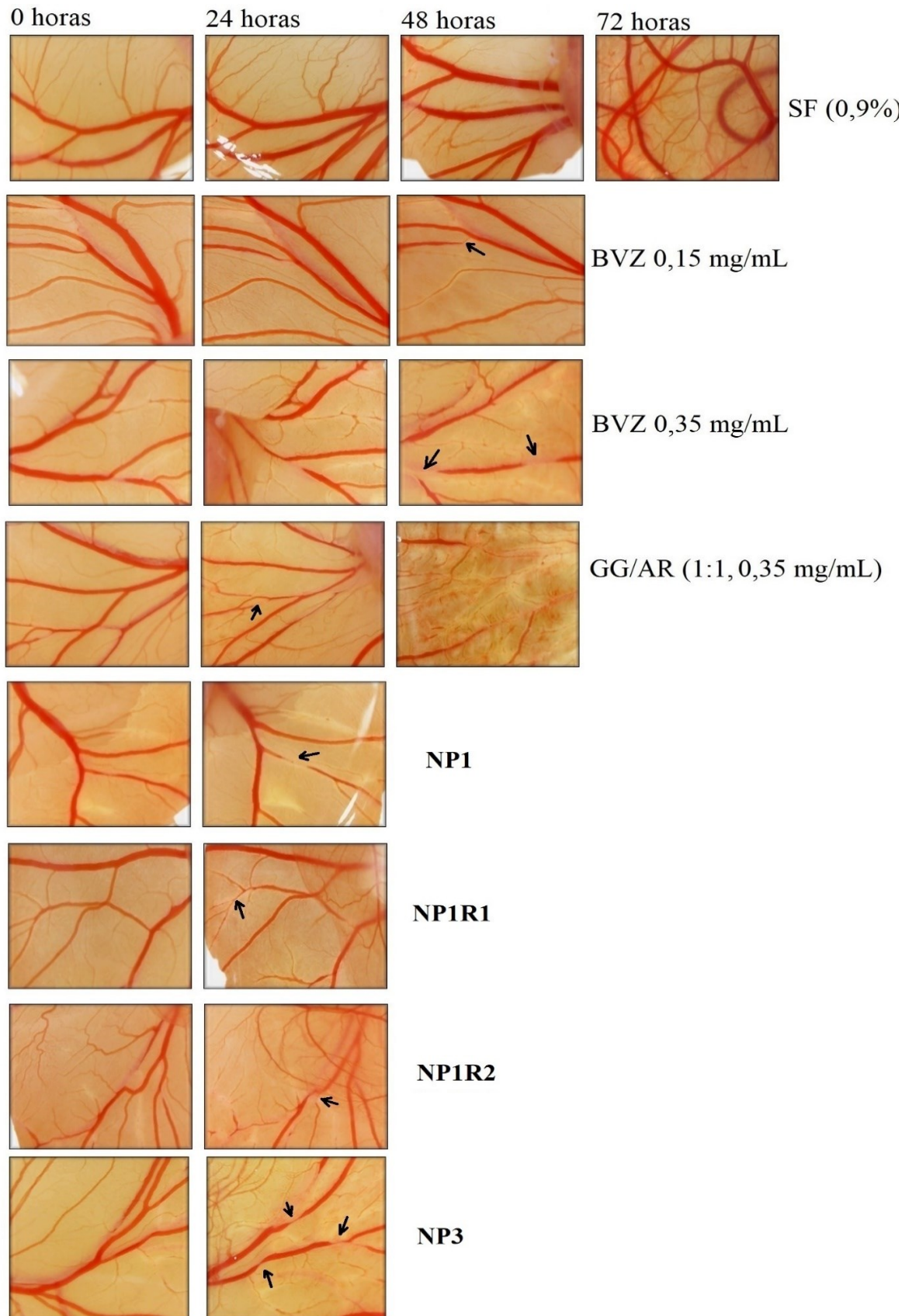


Figura 56. Imagens adquiridas *in ovo* após aplicação no ED6 do experimento para o SF 0,9 % (controle negativo), BVZ (0,15 mg/mL e 0,35 mg/mL) (controle positivo), mistura GG/AR (1:1, v/v; 0,35 mg/mL), NP1, NP1R1, NP1R2 e NP3.

A partir da análise qualitativa das imagens verificou-se que, de maneira geral, todas as amostras estudadas apresentaram uma redução na quantidade de vasos sanguíneos da CAM em relação ao grupo controle, ou seja, a rede vascular tornou-se menos densa com o tempo. Adicionalmente, as imagens revelaram, aparentemente, uma pequena redução do diâmetro dos vasos mais calibrosos e alguns colapsados, como mostram as setas nas imagens (Figura 56).

Para o BVZ livre observou-se que o fármaco promoveu a inibição da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), sendo essa inibição maior quando BVZ estava na máxima concentração (0,35 mg/mL), de modo que a sobrevivência dos embriões foi de 48 horas.

Para a mistura GG/AR verificou-se um potencial efeito anti-angiogênico, evidenciado pela redução da densidade dos vasos de menor calibre e um visível desaparecimento daqueles vasos com maior calibre após 48 horas de exposição (Figura 56).

Para todas as nanopartículas (reticuladas ou não) foi verificado um maior efeito anti-angiogênico, em relação ao BVZ livre e aos polímeros, de modo que os embriões morreram 24 horas após a exposição às nanopartículas. Esse comportamento pode estar relacionado a capacidade das nanopartículas de se difundir e se compartimentalizar ao longo da CAM e, através do controle das taxas de liberação, favorecer as interações do BVZ com uma maior quantidade de fatores pró-angiogênicos (VEGF) presentes na superfície das células endoteliais. Nesse sentido, o bloqueio da angiogênese, necessária para o desenvolvimento dos embriões, levou a morte dos embriões.

Dias (2018), em estudos com nanopartículas poliméricas (Eudragit®) contendo imiquimode, um agente quimioterápico de uso tópico para o tratamento de carcinoma basocelular superficial, verificou que a incorporação do fármaco nas nanopartículas promoveu uma redução significativa da angiogênese, o que foi atribuído a maior internalização do fármaco nas células superficiais da CAM.

Para uma análise quantitativa dos dados, foi realizada a contagem do número de vasos a partir das imagens de cada amostra, e estabelecida uma relação entre o diâmetro (pixels), o número e o comprimento (pixels) dos vasos. Os dados estão apresentados nas Figuras 56-59.

Para o grupo controle (SF 0,9%) (Figura 57), os dados expressam uma ampla vascularização da CAM durante as 72 horas de experimento. Em 24 e 48 horas foi verificado uma redução no número dos vasos de menor calibre (diâmetro de 0-8 pixels; comprimento de 0-25 pixels) (Figura 57), o que não necessariamente representa a destruição dos vasos, mas sim o aumento no seu comprimento para comprimentos de 200-225 pixels. No entanto, em 72 horas verificou-se novamente um aumento no número dos vasos de 0-8 pixels, o que sugere a

formação de novos microvasos (Figura 57). Provavelmente, esse comportamento está relacionado com a redução da atividade proliferativa de vasos por brotamento e a formação de novos vasos a partir da angiogênese intussusceptiva, ou seja, os vasos pré-existentes são duplicados, como mostra a Figura 55. Esses processos ocorrem naturalmente na angiogênese e são responsáveis pela regulação da perfusão sanguínea em função das necessidades metabólicas do tecido (DIAS, 2005; MENEGHELLI, 2013; NEGRÃO, 2012).

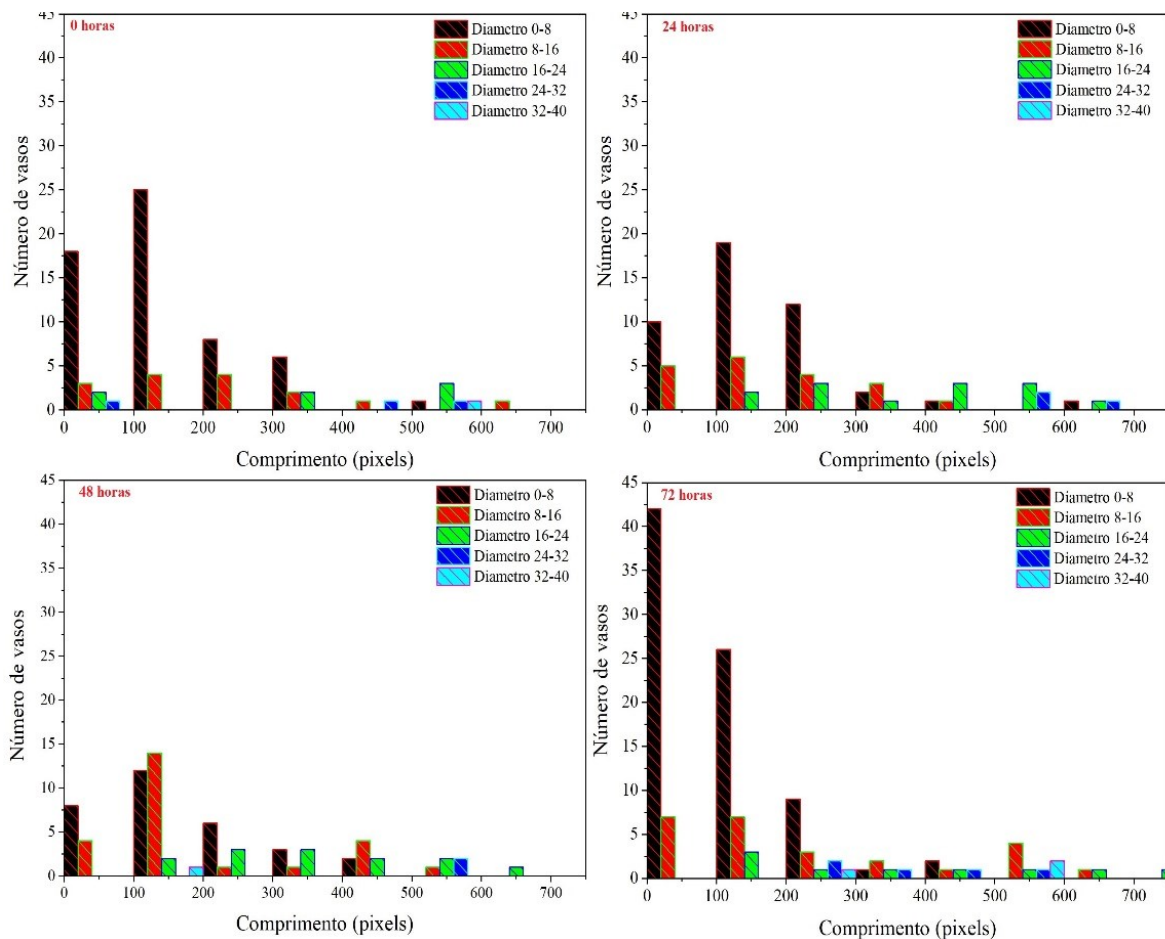


Figura 57. Distribuição da relação diâmetro/comprimento do grupo controle negativo (SF 0,9%) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

No caso da mistura GG/AR (Figura 58) observou-se uma redução mais expressiva da vascularização da CAM, em relação ao controle negativo (SF), principalmente, nos vasos de menor calibre (0-8 pixels) e comprimento (0-25 pixels), de forma que a sobrevivência dos embriões foi de apenas 48 horas, tempo inferior ao controle negativo.

A faixa de pH da CAM (7,2-7,4) favorece a hidrofília da GG e AR, devido a ionização dos grupos carboxílicos e hidroxilas desses polímeros e consequente expansão da rede polimérica. Os mecanismos pelos quais os polímeros atuam sobre a angiogênese não são bem

elucidados na literatura. Porém, acredita-se que o efeito dos polímeros hidrofílicos observado na vasculatura da CAM pode estar relacionado a absorção dos fatores pró-angiogênicos (VEGF) que encontram-se dispersos na matriz biológica, o que inibe a ligação com seus receptores, consequentemente inibindo a angiogênese. Esse comportamento foi previamente relatado por Ferreira e colaboradores (2017), em estudos com hidrogéis de alginato contendo BVZ para terapia antitumoral local.

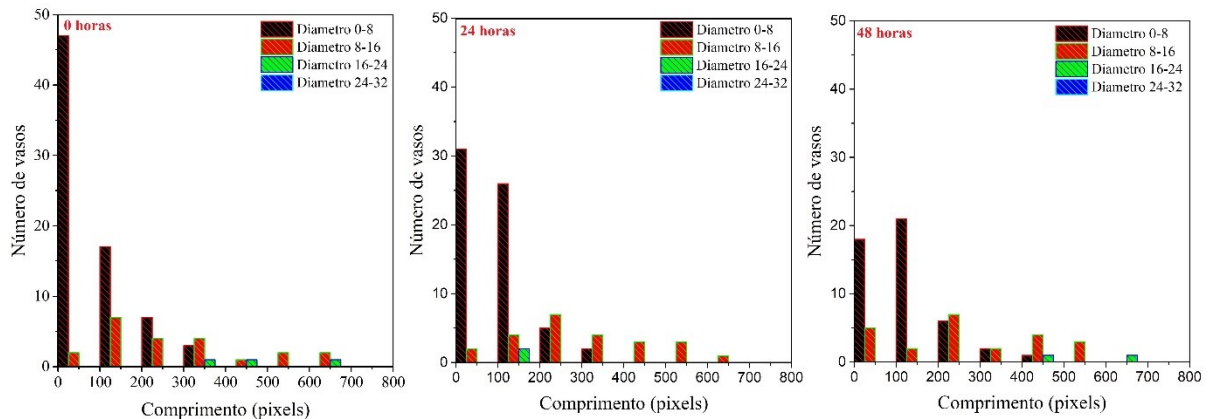


Figura 58. Distribuição da relação diâmetro/comprimento da mistura polimérica (GG/AR) nos tempos 0, 24 e 48 horas.

Para ambas concentrações de BVZ, 0,15 mg/mL (Figura 59 A) e 0,35 mg/mL (Figura 59 B), verificou-se que os vasos mais calibrosos foram conservados; todavia, no caso do BVZ de 0,15 mg/mL observou-se um aumento no número dos vasos menores, de 0-8 pixels de diâmetro e de 0-25 pixels de comprimento, e uma redução dos vasos de menor diâmetro (0-8 pixels) com comprimento entre 100 e 150 pixels. Por outro lado, o BVZ na concentração de 0,35 mg/mL (Figura 59 B) promoveu maior efeito inibidor da angiogênese, pois apesar de permitir o crescimento dos vasos de menores diâmetros (0-8 e 8-16 pixels) no período de 24 horas, verificou-se que, em 48 horas, o número de vasos de todos os diâmetros foi reduzido.

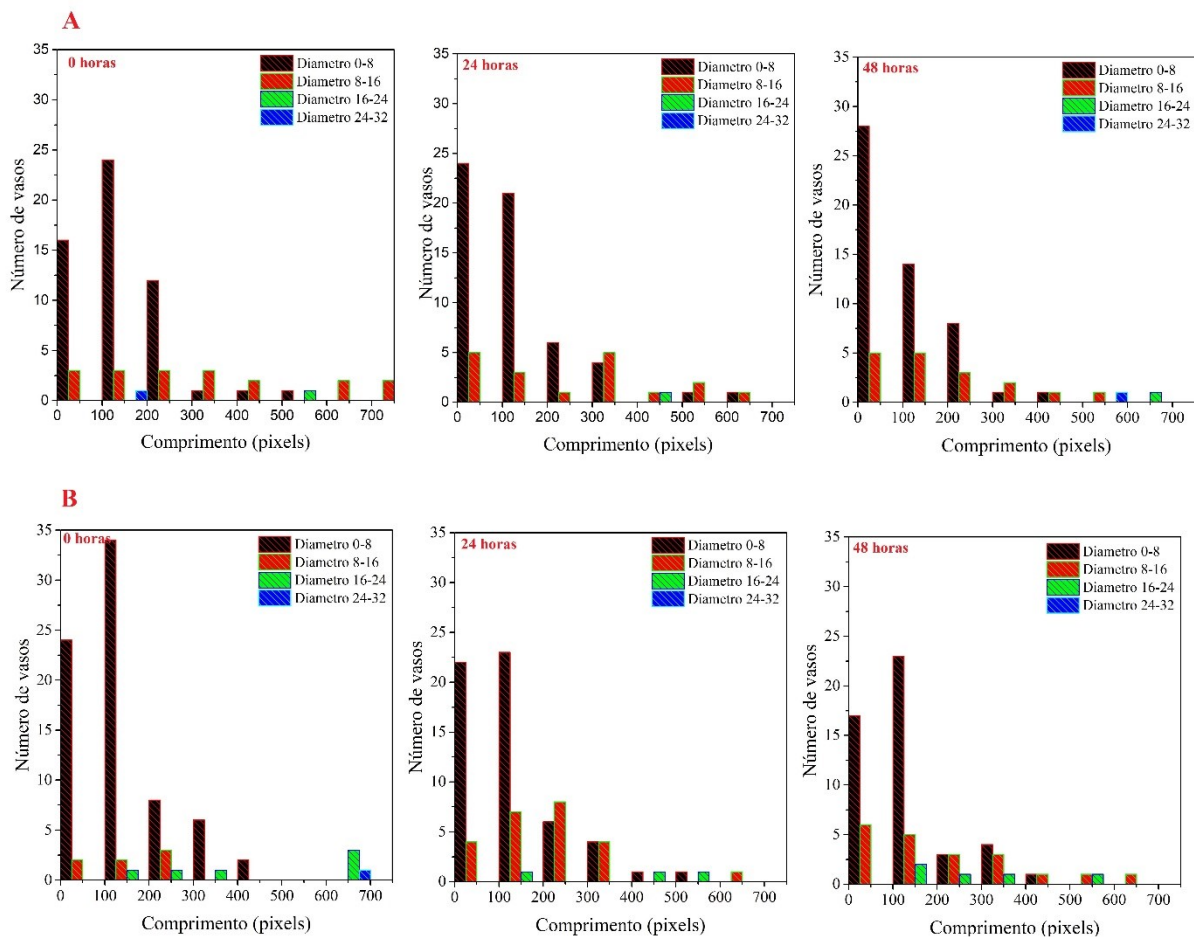


Figura 59. Distribuição da relação diâmetro/comprimento do grupo controle positivo, BVZ 0,15 mg/mL (A) e 0,35 mg/mL (B), respectivamente, nos tempos 0, 24, 48 horas.

Para as todas as nanopartículas, reticuladas ou não, verificou-se que o efeito anti-angiogênico do BVZ, em ambas concentrações (0,15 mg/mL e 0,35 mg/mL), foi maior quando incorporado aos sistemas (Figura 60), os quais exibiram um bloqueio no crescimento de novos vasos e, principalmente, dos vasos de calibre maior, levando a morte dos embriões em 24 horas.

O mecanismo pelo qual o BVZ inibi a angiogênese se dá através da neutralização de isoformas do VEGF (TAUGOURDEAU-RAYMOND; ROUBY; DEFAULT; JEAN-PASTOR; et al., 2012). Como descrito anteriormente, o efetivo controle das taxas de liberação do BVZ a partir das nanopartículas (item 5.8.1), a capacidade dos polímeros absorverem fatores pró-angiogênicos e as interações na nano biointerface, que compreendem as interações entre as superfícies dos nanomateriais e as superfícies de componentes biológicos, devem ter contribuído para a maior atividade anti-angiogênica dos sistemas, levando a menor taxa de sobrevida de todos os embriões (em 24 horas), após exposição as nanopartículas, em relação a sobrevida aos embriões tratados com BVZ livre ou com a mistura GG/AR, que sobreviveram

por mais de 48 horas. Além disso, a incorporação do BVZ em nanopartículas poliméricas pode ainda ter contribuído para manutenção da estabilidade química da proteína protegendo-a contra degradação no ambiente fisiológico (*in ovo*), contribuindo para sua atividade biológica.

De maneira geral, os dados revelaram o potencial efeito anti-angiogênico das nanopartículas, que foram capazes de atuar principalmente nos vasos de maior calibre.

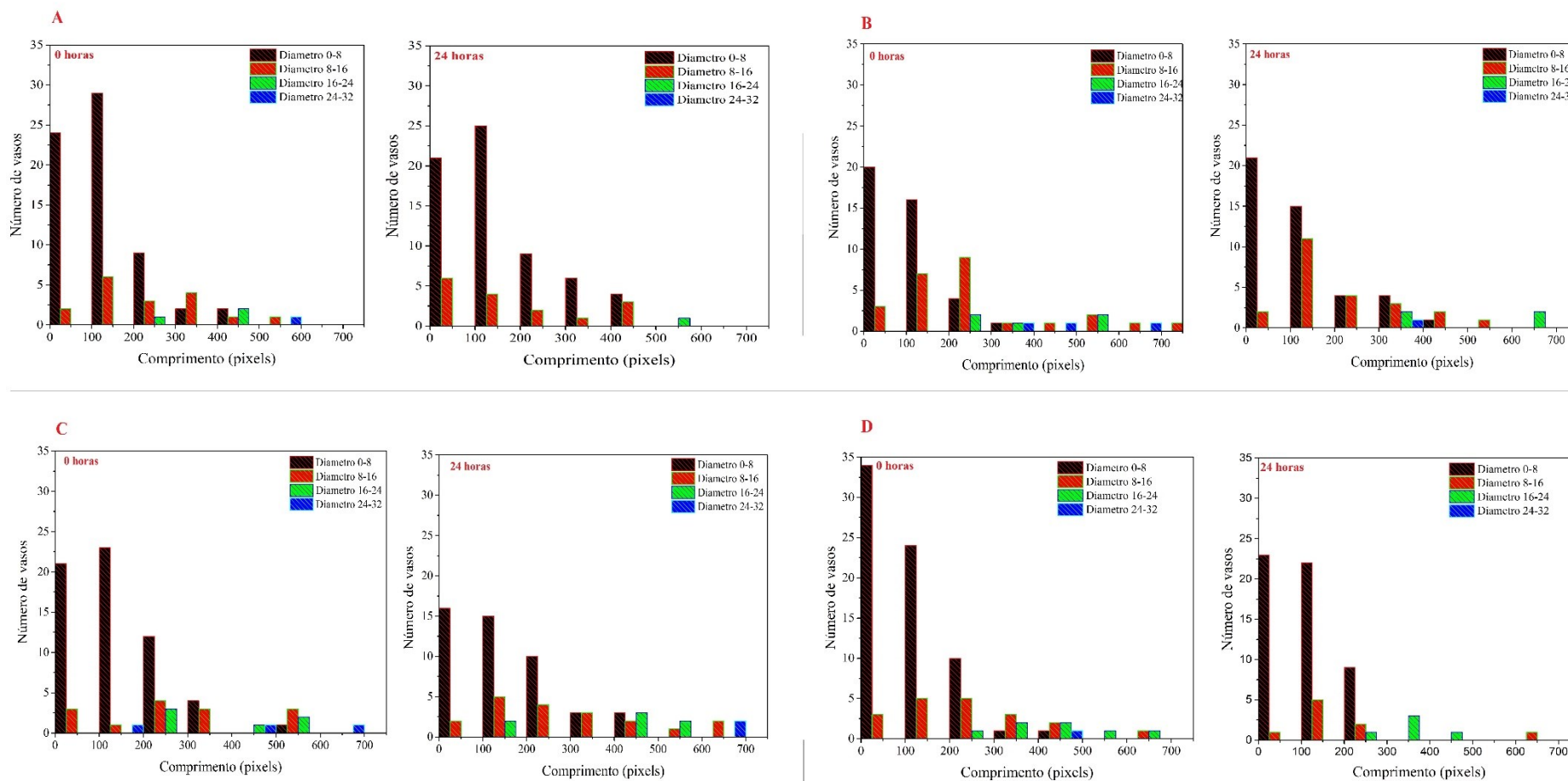


Figura 60. Distribuição da relação diâmetro/comprimento das nanopartículas (A: NP1; B: NP1R1; C: NP1R2 e D: NP3) nos tempos 0 e 24 horas.

O conjunto de dados obtidos demonstrou que a compartimentalização do BVZ em nanopartículas de GG/AR reticuladas ou não promoveu a potencialização do efeito anti-angiogênico no modelo estudado, demonstrando o potencial desses sistemas para o tratamento de tumores sólidos através do bloqueio da angiogênese tumoral.

A liberação sítio específica do BVZ veiculado em nanopartículas poliméricas mucoadesivas, a partir da administração oral, deve favorecer o aumento da concentração local do fármaco, bem como a interação com o meio biológico, potencializando seu efeito sobre a vasculatura na região tumoral. A maximização da resposta terapêutica pode representar, ainda, a possibilidade de redução de dose e, conseqüentemente, dos efeitos adversos sistêmicos do BVZ, como hipertensão, tromboembolismo venoso, disfunção ventricular esquerda, infarto do miocárdio, perfuração gastrointestinal, entre outros (SASICH e SUKKARI, 2012), os quais estão relacionados com a administração de elevadas doses para se alcançar o efeito de inibição da proliferação e migração de células endoteliais em tumores sólidos.

6. CONCLUSÕES

O BVZ apresenta um uso bem estabelecido no tratamento quimioterápico convencional de vários tipos de tumores como o câncer colorretal, no entanto, os efeitos adversos associados a sua ação sistêmica quando administrado pela via endovenosa compromete significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

No presente trabalho, nanopartículas poliméricas foram delineadas como estratégia tecnológica para a liberação cólon-específica do BVZ, a partir da via oral de administração.

Para a obtenção das nanopartículas, os polissacarídeos naturais goma gelana e amido retrogradado, polímeros aniônicos e de elevado peso molecular, foram explorados devido as suas importantes e promissoras propriedades como atoxicidade, ampla biodisponibilidade, biodegradabilidade, além de agregar importante vantagem econômica devido ao seu baixo custo. A retrogradação do amido foi utilizada como um recurso tecnológico para a adequação das propriedades do amido ao objetivo pretendido, particularmente no que se refere a sua solubilidade em meio ácido e resistência enzimática. A natureza catiônica do BVZ foi explorada para a formação de complexos polieletrólíticos com a goma gelana e o amido retrogradado, para a obtenção de sistemas nanoestruturados.

As nanopartículas foram obtidas com sucesso, pelas técnicas de complexação polieletrólítica e reticulação iônica, e elevados teores de incorporação do BVZ foram alcançados. A reticulação iônica com cloreto de alumínio contribuiu para a formação de estruturas mais fortes e interconectadas. O uso de condições reacionais amenas, evitando o uso de solventes orgânicos e elevada temperatura garantiu a integridade estrutural do BVZ e representa uma condição favorável ao processo de transposição de escala para a produção industrial.

As nanoestruturas apresentaram forma esférica, diâmetros entre 191,7 e 629,9 nm e potencial zeta negativo, atributos que podem contribuir para a estabilidade física do sistema, bem como para a interação com a interface biológica.

As propriedades mucoadesivas das nanopartículas, em pH 6,8, foram demonstradas e o processo de reticulação iônica mostrou-se uma potencial ferramenta para restringir a mucoadesão em ambiente ácido.

O efetivo controle das taxas de liberação do BVZ nos diferentes valores de pH avaliados, as propriedades mucoadesivas e a reduzida permeabilidade do BVZ incorporado às nanopartículas são atributos favoráveis ao acúmulo do fármaco no sítio de ação, favorecendo a

ação local. A preservação da integridade estrutural do BVZ incorporado as nanopartículas, após a incubação nos diferentes meios avaliados nesse estudo, demonstram que os nanocarreadores ofereceram a efetiva proteção ao BVZ.

A potencialização da atividade anti-angiogênica do BVZ, após a nano-compartmentalização, foi evidenciada pela expressiva redução da angiogênese em modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM).

O conjunto de dados obtidos demonstra que as nanopartículas desenvolvidas no presente estudo representam uma promissora plataforma tecnológica para a liberação cólon específica do BVZ, visando a ação no sítio de ação, a partir da administração oral, o que representa um importante avanço na busca por alternativas ao tratamento por infusão endovenosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AHMADI, F. et al. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 1, p. 1, 2015.

AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and industrial pharmacy**, v. 23, n. 5, p. 489-515, 1997.

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.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010. ISBN 8582714238.

ALI, S.; RYTTING, E. Influences of nanomaterials on the barrier function of epithelial cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 811, p. 45-54, 2014.

ALVAREZ-LORENZO, C. et al. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1148-1171, 2013.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

AMORIM, A. Caracterização reológica da mistura de Carboximetilcelulose com amido de milho e Avaliação da microestrutura para estudo de viabilidade em aplicações tecnológicas. **Rio de Janeiro: UEZO**, 2012.

ANDREANI, T. et al. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 93, p. 118-26, Jun 2015.

- ANDREW, J. S. et al. Sustained release of a monoclonal antibody from electrochemically prepared mesoporous silicon oxide. **Advanced functional materials**, v. 20, n. 23, p. 4168-4174, 2010.
- 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.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, Jr. L.V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas; sistemas de liberação de fármacos**. 6ªEd. São Paulo: Ed. Premier, 2000. 548p.
- ASHWAR, B. A. et al. Production of resistant starch from rice by dual autoclaving-retrogradation treatment: Invitro digestibility, thermal and structural characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 108-117, 2016.
- ASLAN, B.; OZPOLAT, B.; SOOD, A.K.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Nanotechnology in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 10, p. 904-913, 2013.
- AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010.
- BABU, R. J. et al. Formulation of controlled release gellan gum macro beads of amoxicillin. **Current Drug Delivery**, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2010.
- BADIEE, P. et al. Ocular Implant Containing Bevacizumab-Loaded Chitosan Nanoparticles Intended for Choroidal Neovascularization Treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2018.
- BALIMANE, P. V.; HAN, Y.-H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **The AAPS journal**, v. 8, n. 1, p. E1-E13, 2006.
- BALKE, M. et al. Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. **BMC research notes**, v. 3, n. 1, p. 58, 2010.
- BALNY, C.; MASSON, P.; HEREMANS, K. **Frontiers in high pressure biochemistry and biophysics**. Elsevier, 2002. ISBN 0444510990.

- BANERJEE, A. et al. Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1224-1232, 2017.
- BANSIL, R.; TURNER, B. S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biosoumedical applications. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 11, n. 2-3, p. 164-170, 2006.
- BANTLE, S.; SCHMIDT, M.; BURCHARD, W. Simultaneous static and dynamic light scattering. **Macromolecules**, v. 15, n. 6, p. 1604-1609, 1982.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Elsevier, 1989. ISBN 0080933696.
- BARROS NETO, B.B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos:- Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010. ISBN 8577807134.
- BARTH, A. The infrared absorption of amino acid side chains. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 74, n. 3, p. 141-173, 2000.
- BASIT, A. W. Advances in colonic drug delivery. **Drugs**, v. 65, n. 14, p. 1991-2007, 2005.
- BEMILLER, J. N. Pasting, paste, and gel properties of starch–hydrocolloid combinations. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 386-423, 2011.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 35-52, 2004.
- BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis research**, v. 101, n. 2-3, p. 157-170, 2009.
- BEZERRA, J. M. N. A. Avaliação de aspectos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados polímeros para administração oral de insulina. 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2016.
- BHARDWAJ, T. R. et al. Natural Gums and Modified Natural Gums as Sustained-Release Carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 10, p. 1025-1038, 2000.

BHARVADA, E.; SHAH, V.; MISRA, M. Exploring mixing uniformity of a pharmaceutical blend in a high shear mixture granulator using enthalpy values obtained from DSC. **Powder Technology**, v. 276, n. Supplement C, p. 103-111, 2015.

BHISE, N. S. et al. Drug delivery strategies for therapeutic angiogenesis and antiangiogenesis. **Expert opinion on drug delivery**, v. 8, n. 4, p. 485-504, 2011.

BICALHO, L. A. **Caracterização termo-óptica quantitativa de fibras de poliéster e seus compósitos com polietileno**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - **Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR**, São Carlos, 2016.

BILIADERIS, C. G. Chapter 8 - Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch. In: BEMILLER, J. e WHISTLER, R. (Ed.). **Starch (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p.293-372. ISBN 978-0-12-746275-2.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1-2, p. 115-130, 2004.

BOND, L. et al. Differential scanning calorimetry and scanning thermal microscopy analysis of pharmaceutical materials. **International journal of pharmaceutics**, v. 243, n. 1, p. 71-82, 2002.

BONI, F. I. et al. Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 73-82, 2018.

BONI, F. I. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com propriedades mucoadesivas baseadas em ácido hialurônico para liberação cólon específica de metotrexato**. 2017. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" - Faculdade De Ciências Farmacêuticas, Araraquara. 2017.

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**, v. 42, n. 8, p. 1283-1290, 2016.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 11, p. 1649-59, Sep 22 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Validação de métodos analíticos. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 2017.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRETAS, R. E. **Reologia de polímeros fundidos**. Editora da UFSCar, 2005.

BRUNER, C.; DAUSKARDT, R. Role of Molecular Weight on the Mechanical Device Properties of Organic Polymer Solar Cells. **Macromolecules**, v. 47, n. 3, p. 1117-1121, 2014/02/11 2014.

CAMPANA, P. T. **Desnaturação e reovelamento da frutalina, uma lectina ligante de D galactose**. 1998. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 1998. doi:10.11606/D.76.1998.tde-03092008-154638. Acesso em: 2019-03-15.

CARAMELLA, C. et al. Rheological and tensile tests for the assessment of polymer-mucin interactions. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 40, n. 4, p. 213-217, 1994.

CARAMELLA, C.; ROSSI, S.; BONFERONI, M. A rheological approach to explain the mucoadhesive behavior of polymer hydrogels. **Drugs and the pharmaceutical sciences**, v. 98, p. 25-65, 1999.

CARBINATTO, F. M. et al. 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. et al. 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. et al. Preparation and Characterization of Amylose Inclusion Complexes for Drug Delivery Applications. **J Pharm Sci**, v. 105, n. 1, p. 231-41, Jan 2016.

- CARDOSO, V. M. O. **Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos.** 2014b. 198f Mestrado (Mestre). Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”. 2014.
- CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.
- CELLI, J. P. et al. Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol– gel transition. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1580-1586, 2007.
- CENTER, M. M.; JEMAL, A.; WARD, E. International trends in colorectal cancer incidence rates. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 18, n. 6, p. 1688-1694, 2009.
- CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The use of xanthan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 4, p. 1117-1127, 2002.
- CHAKRABORTY, S. et al. Gellan gum microspheres containing a novel α -amylase from marine *Nocardiosis* sp. strain B2 for immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 292-299, 2014.
- CHAN, E.-S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1267-1275, 2011.
- CHAURASIA, M. et al. Methotrexate bearing calcium pectinate microspheres: a platform to achieve colon-specific drug release. **Current drug delivery**, v. 5, n. 3, p. 215-219, 2008.
- CHELLAPPAN, D. K. et al. The role of bevacizumab on tumour angiogenesis and in the management of gynaecological cancers: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 1127-1144, 2018.
- CHEN, L. et al. Efficient Production of a Bioactive Bevacizumab Monoclonal Antibody Using the 2A Self-cleavage Peptide in Transgenic Rice Callus. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1156, 2016.
- CHEN, S. C. et al. Antiangiogenic activities of polysaccharides isolated from medicinal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 2, p. 247-254, 2005.

CHENG, S. Z. D. et al. Thermal analysis: the next two decades. **Thermochimica Acta**, v. 355, n. 1, p. 59-68, 2000/07/31/ 2000.

CHIU, M. H.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry: an invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39, 2011.

CHO, E. J. et al. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 2013.

CHUNG, H.-J.; LIM, H. S.; LIM, S.-T. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 3, p. 353-359, 2006.

CLAS, S.-D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

CLAYTON, K. N. et al. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. **Biomicrofluidics**, v. 10, n. 5, p. 054107-054107-14, 2016.

COIMBRA, P. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. 2010. 242f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

COSTA, A. M.; SILVA, V. V. Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2017.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CURY, B. et al. 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. et al. Influence of phosphated cross-linked high amylose on in vitro release of different drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 789-793, 11/17/ 2009b.

DAKHARA, S.; ANAJWALA, C. Polyelectrolyte complex: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 2, p. 121, 2010.

DE CASTRO COTTI, G. C. et al. Genética do câncer colorretal. **Revista de Medicina**, v. 79, n. 2-4, p. 65-72, 2000.

DE FÁTIMA, L. A.; DE CARVALHO PAPA, P. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 22-27, 2018.

DE MUYNCK, B.; NAVARRE, C.; BOUTRY, M. Production of antibodies in plants: status after twenty years. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 5, p. 529-563, 2010.

DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M. et al. 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.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre. EdiPUCRS, 2007. 60 p. ISBN 8574307025.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. D. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 945-954, 2009.

DESESSO, J. M. Vascular ontogeny within selected thoracoabdominal organs and the limbs. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 3-20, 2017.

DESPACHO Camel City. Página inicial. Disponível em: <http://www.camelcitydispatch.com/can-winston-salem-based-alt-energy-nano-tech-be-used-to-combat-cancer/nrmicro2437-f2/>. Acesso em: 12/03/2018.

DIAS, M. F. **Desenvolvimento e avaliação da atividade quimiopreventiva de nanopartículas contendo imiquimode em modelo murino de câncer de pele**. 2018. 102 f. Tese (Doutorado em Nanotecnologia Farmacêutica) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

DIAS, P. F. **Modulação da vasculogênese, angiogênese e de desenvolvimento tumoral por derivados de *Sargassum stenophyllum* (Phaeophyceae)**. 2005. 181 f. 2005. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

- DIMANTOV, A. et al. Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, n. 1, p. 93-100, 2004.
- DING, Y. et al. Synthesis and characterization of retrograded starch nanoparticles through homogenization and miniemulsion cross-linking. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 656-665, 2016.
- DJONOV, V. G.; GALLI, A. B.; BURRI, P. H. Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane. **Anatomy and embryology**, v. 202, n. 5, p. 347-357, 2000.
- DONA, A. C. et al. Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 599-617, 2010.
- DONG, A.; HUANG, P.; CAUGHEY, W. S. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. **Biochemistry**, v. 29, n. 13, p. 3303-3308, 1990.
- DOS SANTOS, A. M. et al. Computational and experimental approaches for development of methotrexate nanosuspensions by bottom-up nanoprecipitation. **International journal of pharmaceutics**, v. 524, n. 1-2, p. 330-338, 2017.
- DUAN, Y. et al. Novel in situ gel systems based on P123/TPGS mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 322-330, 2015.
- DUDHANI, A. R.; KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 243-251, 2010.
- DUYGU, D. Y. et al. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies (review). **Gazi University Journal of Science**, v. 22, n. 3, p. 117-121, 2009.
- EGOSHI, C. T. et al. Quantification Of Tumor-Induced Angiogenesis On Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 303-310, 2015.
- EHRKE, M. J. Immunomodulation in cancer therapeutics. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 8, p. 1105-1119, 2003.
- ELBAKRI, A.; NELSON, P. N.; ODEH, R. O. A. The state of antibody therapy. **Human immunology**, v. 71, n. 12, p. 1243-1250, 2010.

ELIASSON, A.-C. **Starch in food: Structure, function and applications**. CRC Press, 2004. ISBN 0849325552.

ELYAGOBY, A.; LAYAS, N.; WONG, T. Colon-specific delivery of 5-fluorouracil from zinc pectinate pellets through In Situ intracapsular ethylcellulose–pectin plug formation. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 102, n. 2, p. 604-616, 2013.

ENOKI, Thaís Azevedo. **Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/D.43.2010.tde-20012011-155955.

ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631-648, 2015.

FABIAN, H.; MÄNTELE, W. Infrared spectroscopy of proteins. **Handbook of vibrational spectroscopy**, 2002.

FADDA, H.; BASIT, A. Gastrointestinal tract: obstacles or opportunities in drug targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1, p. 52-59, 2005.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 136-151, 2011.

FASOLIN, L. H. et al. Production of hybrid gels from polysorbate and gellan gum. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 501-507, 2013.

FÁTIMA, L. A. D.; PAPA, P. D. C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**, 2010.

FEKETE, S. et al. Comparative study of recent wide-pore materials of different stationary phase morphology, applied for the reversed-phase analysis of recombinant monoclonal antibodies. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 10, p. 3137-3151, 2013.

FEKETE, S. et al. Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase stationary phases. **Journal of separation science**, v. 35, n. 22, p. 3113-3123, 2012.

- FERNANDES, M. B. et al. Caco-2 cells permeability evaluation of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Drug Dev Ind Pharm**, v. 41, n. 7, p. 1066-72, 2015.
- FERRARA, N. et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 5, p. 391-400, 2004.
- FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.
- FERRARA, N.; HILLAN, K. J.; NOVOTNY, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 333, n. 2, p. 328-335, 2005.
- FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-71, Mar 2005.
- FERRARI, P. C. et al. Development and in vitro evaluation of coated pellets containing chitosan to potential colonic drug delivery. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 1, p. 244-252, 2013.
- FERREIRA, A. E. R. **Desenvolvimento de sistema biodegradável contendo bevacizumabe para inibição da neovascularização da córnea**. 2014. 122 f. (Tese, doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Belo Horizonte, Belo horizonte, 2014.
- FERREIRA, N. N. et al. Alginate hydrogel improves anti-angiogenic bevacizumab activity in cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 271-282, 2017.
- FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.; VEIGA, F. **Sistemas mucoadesivos de administração de fármacos na cavidade oral: Mecanismo de mucoadesão e Polímeros mucoadesivos / Mucoadhesive drug delivery systems in the oral cavity: Mucoadhesive mechanism and mucoadhesive polymers**. Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, [S.l.], n. 2, feb. 2009. ISSN 1646-3854.
- FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 2, p. 273-286, 2002.

- FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 4981-5003, 2015.
- FONTE, P. et al. Oral nanotechnological approaches for colon-specific drug delivery. In: (Ed.). **Nanoparticles in Life Sciences and Biomedicine**: Pan Stanford, 2018. p.133-168.
- FREIRE, A. C. et al. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I-O cólon como local de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 319-335, 2006.
- FREIRE, A. C. et al. Starch-based coatings for colon-specific drug delivery. Part I: The influence of heat treatment on the physico-chemical properties of high amylose maize starches. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 574-586, 2009.
- FREITAS, M. A. A. **Desenvolvimento e emprego de metodologias analíticas complementares para avaliação da estabilidade do medicamento constituído pelo anticorpo monoclonal bevacizumabe (avastin®) fracionado por farmácias de manipulação**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal De Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2014.
- FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 2, p. 247-265, 2005.
- GALFRASCOLI, E. et al. Risk/benefit profile of bevacizumab in metastatic colon cancer: A systematic review and meta-analysis. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, n. 4, p. 286-294.
- GALLAGHER, W. FTIR analysis of protein structure. **Course manual Chem**, v. 455, 2009.
- GALWEY, A.; CRAIG, D. Thermogravimetric analysis: basic principles. **Thermal analysis of pharmaceuticals**. New York: CRC, p. 139-91, 2007.
- GARCIA, A. A. et al. Phase II clinical trial of bevacizumab and low-dose metronomic oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer: a trial of the California, Chicago, and Princess Margaret Hospital phase II consortia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 1, p. 76-82, 2008.
- GAUMET, M. et al. 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.

GELBAND, H. et al. **Disease Control Priorities, (Volume 3): Cancer.** World Bank Publications, 2015. ISBN 1464803692.

GHISAIDOOBE, A. B.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 12, p. 22518-22538, 2014.

GIANTONIO, B. J. et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 12, p. 1539-44, Apr 20 2007.

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

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques : JBT**, v. 21, n. 4, p. 167-193, 2010.

GONÇALVES, J. E. **Padronização das condições para cultura de células Caco-2 visando à obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade in vitro da rifampicina.** 2010. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GRASSI, G. et al. **Understanding drug release and absorption mechanisms: a physical and mathematical approach.** CRC press, 2006. ISBN 1420004654.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-90, 2006.

GROTNEY, A. et al. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 33, p. 5326-34, Nov 20 2008.

GUBBALA, S. Polyelectrolyte complex: a pharmaceutical review. **Int J Pharm Biol Sci**, v. 2, n. 3, p. 399-407, 2012.

GUERRA DORE, C. M. P. et al. Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed. **Microvascular Research**, v. 88, p. 12-18,

2013.

GUPTA, S. V. Physicochemical Requirements for Polymers and Polymer-Based Nanomaterial for Ophthalmic Drug Delivery. In: PATHAK, Y.;SUTARIYA, V., *et al* (Ed.). **Nano-Biomaterials For Ophthalmic Drug Delivery**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p.131-146. ISBN 978-3-319-29346-2.

GUPTE, A.; CIFTCI, K. Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel+ 5-FU microspheres. **International journal of pharmaceutics**, v. 276, n. 1, p. 93-106, 2004.

GUSTAVSSON, B. *et al*. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-10, Mar 2015.

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.

HÄGERSTRÖM, Helene. **Polymer gels as pharmaceutical dosage forms: rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery**. 2003. 77 f. Tese de Doutorado. Acta Universitatis Upsaliensis, Upsala, 2003.

HAGESAETHER, E.; HIORTH, M.; SANDE, S. A. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: an in vitro and ex vivo study. **European Journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 325-331, 2009.

HAN, J.-A.; LIM, S.-T. Structural changes of corn starches by heating and stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI system. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 3, p. 265-272, 2004.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. 23 Nanoparticles for Drug Delivery. 2006.

HARALAMPU, S. G. Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS3. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 3, p. 285-292, 2000.

HASHEMINYA, S.-M. *et al*. Production of a fiber-enriched pasteurized and non-pasteurized fermented acidified drink using gellan. **Food Bioscience**, v. 3, p. 29-35, 2013.

HASSAN, E. E.; GALLO, J. M. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. **Pharmaceutical research**, v. 7, n. 5, p. 491-495, 1990.

HIDALGO, I. J. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 1, n. 5, p. 385-401, 2001.

HOOVER, R. et al. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 399-413, 2010/03/01/ 2010.

HORINAKA, J.-I. et al. Effect of pH on the conformation of gellan chains in aqueous systems. **Biophysical Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 223-227, 2004.

HTOON, A. et al. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 236-245, 2009.

HTOON, A. K. et al. The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 140-149, 2010.

HUA, S. et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: selective targeting to diseased versus healthy tissue. **Nanomedicine**, v. 11, n. 5, p. 1117-32, Jul 2015.

HUANG, C.-Y.; HSIEH, M.-C.; ZHOU, Q. Application of Tryptophan Fluorescence Bandwidth-Maximum Plot in Analysis of Monoclonal Antibody Structure. **AAPS PharmSciTech**, p. 1-8, 2016.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2111, 2007.

HURWITZ, H. et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 23, p. 2335-2342, 2004.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. p.25-27.

INAMDER, N.; MOURYA, V. Chitosan and anionic polymers–complex formation and applications. **Polysaccharides: Development, Properties and Applications**, Nova Science Publishers, New York, p. 333-376, 2010.

INCA, I. N. D. C.-. **O que é o câncer?** . Disponível em <www.inca.gov.br> 2018.

- IOANNOU, J. C.; DONALD, A. M.; TROMP, R. H. Characterising the secondary structure changes occurring in high density systems of BLG dissolved in aqueous pH 3 buffer. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 216-225, 2015.
- IONESCU, R. M. et al. Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies. **J Pharm Sci**, v. 97, n. 4, p. 1414-26, Apr 2008.
- IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 17–18, p. 812-818, 2006.
- JAFARI, S. M. et al. Release, Characterization, and Safety of Nanoencapsulated Food Ingredients. In: (Ed.). **Nanoencapsulation of food bioactive ingredients**: Academic Press, 2017. p.401-453.
- JAIN, A. et al. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. **Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 179-90, Feb 2010.
- JAIN, N. K.; ROY, I. Effect of trehalose on protein structure. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 18, n. 1, p. 24-36, 2009.
- JANA, S. et al. Aceclofenac-loaded unsaturated esterified alginate/gellan gum microspheres: In vitro and in vivo assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 129-137, 2013.
- JANEWAY C. A. JR.; TRAVERS P.; WALPORT M.; et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. **The structure of a typical antibody molecule.**
- JOHANSSON, M. E.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 352-361, 2013.
- JONES, D. S. Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. **International journal of pharmaceutics**, v. 179, n. 2, p. 167-178, 1999.
- JONG, S.; VAN DE VELDE, F. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1172-1187, 2007.

- KANG, D. et al. Gellan. **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**, p. 1627-1682, 2015.
- KANMERT, D. **Structure and Interactions of Human IgG-Fc**. 2011. 71f. Tese (Doutorado) - Linköping University; 2011.
- KARIM, A. A.; NORZIAH, M.; SEOW, C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food chemistry**, v. 71, n. 1, p. 9-36, 2000.
- KATUWAL, N. **The Effects of Nanoparticle Drug Delivery Formulations on the Rheological Properties of Mucus**. 2017. 162f. Norwegian University of Science and Technology, 2017.
- KAZAZI-HYSENI, F.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Bevacizumab. **The Oncologist**, v. 15, n. 8, p. 819-825, August 1, 2010.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.
- KHONDKAR, D. et al. 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.
- KIM, S. J.; PARK, Y.; HONG, H. J. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. **Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)**, v. 20, n. 1, 2005.
- KIRCHHOFF, P.; CLAVIEN, P. A.; HAHNLOSER, D. Complications in colorectal surgery: risk factors and preventive strategies. **Patient Safety in Surgery**, v. 4, n. 1, p. 5, 2010.
- KIRCHMAJER, D. M. et al. Enhanced gelation properties of purified gellan gum. **Carbohydrate research**, v. 388, p. 125-129, 2014.
- KIZILAY, E.; KAYITMAZER, A. B.; DUBIN, P. L. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. **Advances in colloid and interface science**, v. 167, n. 1-2, p. 24-37, 2011.
- KLEIN, A.; LOEWENSTEIN, A. CHAPTER 32 - Therapeutic monoclonal antibodies and fragments: bevacizumab. In: NGUYEN, Q. D.; RODRIGUES, E. B., et al (Ed.). **Retinal Pharmacotherapy**. Edinburgh: W.B. Saunders, 2010. p.219-225. ISBN 978-1-4377-0603-1.

- KOBAYASHI, T. et al. A chick embryo model for metastatic human prostate cancer. **European urology**, v. 34, n. 2, p. 154-160, 1998.
- KÖHLER, K. et al. High pressure emulsification with nano-particles as stabilizing agents. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 10, p. 2957-2964, 2010.
- KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.
- KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International journal of pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.
- KOTOWSKI, K. et al. Contemporary management and novel therapies in ovarian cancer—literature review. **World Scientific News**, v. 111, p. 51-63, 2018.
- KOZOVSKA, Z.; GABRISOVA, V.; KUCEROVA, L. Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, n. 8, p. 911-916, 2014.
- KRATZ, J. M. Implementação e aplicação do modelo in vitro com células Caco-2 para estudo da permeabilidade intestinal de fármacos. 2011.
- KREUTER, J. Nanoparticles—a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1-10, 2007.
- KULKARNI, R. V. et al. 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.
- KUMAR, S. et al. Ketoconazole encapsulated in chitosan-gellan gum nanocomplexes exhibits prolonged antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 988-994, 2016.
- 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.
- LABIANCA, R.; BERETTA, G. D.; KILDANI, B.; MILESI, L.; MERLIN, F.; MOSCONI, S.; PESSI, M. A.; PROCHILO, T.; QUADRI, A.; GATTA, G.; DE BRAUD, F.; WILS, J. Colon cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 74, n. 2, p. 106-133, 2010.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 481-487, 2009.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.

LI, F.; HURLEY, B.; LIU, Y.; LEONARD, B.; GRIFFITH, M. Controlled release of bevacizumab through nanospheres for extended treatment of age-related macular degeneration. **The open ophthalmology journal**, v. 6, p. 54, 2012.

LI, S. et al. In vitro release of protein from poly (butylcyanoacrylate) nanocapsules with an aqueous core. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 5, p. 480-485, 2005.

LIECHTY, W. B.; PEPPAS, N. A. Expert opinion: responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 241-246, 2012.

LIMA, R. G. D. **Síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas para veiculação de lignanas bioativas**. 2018. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2018.

LIU, H. et al. Retrogradation of corn starch after thermal treatment at different temperatures. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 4, p. 756-762, 2007.

LIU, H. et al. Thermal behaviour of high amylose cornstarch studied by DSC. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 1, 2005.

LIU, L. et al. Chitosan fibers enhanced gellan gum hydrogels with superior mechanical properties and water-holding capacity. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 152-158, 2013.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. Scientific American Books New York, 1995.

LOKMAN, N. A. et al. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis.

International journal of molecular sciences, v. 13, n. 8, p. 9959-9970, 2012.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Modified release of drug delivery systems: hydrophilic polymers. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LU, J.-F. et al. Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 779-786, 2008.

LUANGTANA-ANAN, M. et al. Effect of chitosan salts and molecular weight on a nanoparticulate carrier for therapeutic protein. **Pharmaceutical development and technology**, v. 10, n. 2, p. 189-196, 2005.

LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 353-367, 2014.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofilicos e Mucoadesivos para Liberação de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MA, J.; WAXMAN, D. J. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 12, p. 3670-84, 2008.

MA, L.; LIU, C. Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 2, p. 448-453, 2010.

MA, Y.; COOMBES, A. G. Designing colon-specific delivery systems for anticancer drug-loaded nanoparticles: an evaluation of alginate carriers. **J Biomed Mater Res A**, v. 102, n. 9, p. 3167-76, 2014.

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, p. 167-178, 1998.

- 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, p. 12-19, 2015.
- MAHESH D, B. et al. Preparation and Characterization of Polyaniline-Co3O4 Nanocomposites via Interfacial Polymerization. **Journal of Metallurgy and Materials Science**, v. 52, p. 149-154, 2010.
- MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **Eur J Pharm Sci**, v. 42, n. 5, p. 445-51, 2011.
- MALEKI, A. et al. Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 2, p. 328-340, 2008.
- MARCOMINI, R.; SOUSA, D. Caracterização microestrutural de materiais cerâmicos utilizando o programa de processamento digital de imagens Image J. **Cerâmica**, v. 57, n. 341, p. 100-105, 2011.
- MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular basis of colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 25, p. 2449-2460, 2009.
- MARTÍN, G. P. **Estudo da viscoelasticidade linear e não linear de misturas de PP/PA-6 compatibilizadas ou não**. 2006. 299f. Doutorado (Doutor em Engenharia e Materiais). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2006.
- MATHEUS, S.; FRIESS, W.; MAHLER, H.-C. FTIR and nDSC as analytical tools for high-concentration protein formulations. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 6, p. 1350-1363, 2006.
- MATSUURA, Y. et al. Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100 °C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. **Scientific Reports**, v. 5, p. 15545, 2015.
- MATTOS, A.C. **Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de PLA e PLAPEG contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica**. 2013. 110f. Dissertação (Mestrado em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia) Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.
- MEHBOOB, R. et al. NATURAL POLYSACCHARIDES AS DRUG TARGETING TOOL TO COLON: RECENT APPLICATIONS AND FUTURE PROSPECTIVE. **International**

Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences, v. 5, n. 2, 2015.

MEKA, V. S. et al. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 11, p. 1697-1706, 2017.

MENEGHELLI, C. **Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico de própolis catarinense na formação de vasos sanguíneos**. 2013. 182 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2013.

MENEGUIN, A. B. et al. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 123, p. 84-94, 2018.

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.

MERTINS, O. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana**. 2008. 206 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MI, K. et al. Integrating Systemic and Surgical Approaches to Treating Metastatic Colorectal Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 199-214, 2015.

MIKLI, V. et al. Characterization of powder particle morphology. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences: Engineering(Estonia)**, v. 7, n. 1, p. 22-34, 2001.

MISHRA, J. et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 86, n. 3, p. 232-50, Jun 2013.

MIZRAHY, S.; PEER, D. ChemInform Abstract: Polysaccharides as Building Blocks for Nanotherapeutics. **Chemical Society reviews**, v. 41. P. 2623-40, 2011.

- MOELLER, E. H.; JORGENSEN, L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 5, n. 2–3, p. e89-e94, 2008.
- MOHAMMADIFAR, M. A. et al. Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, n. 1, p. 31-39, 2006.
- MOHAPATRA, S.; NAGARAJ, S.; MOHAPATRA, S. S. Nano/bio interface: impact on drug delivery applications. **Drug Deliv Transl Res**, v. 3, n. 4, p. 295-6, 2013.
- MORADI-AFRAPOLI, F. et al. In vitro transport studies with kaempferol and its anxiolytic metabolite 4-HPAA in human cell models. **Planta Medica**, v. 79, n. 13, p. SL73, 2013.
- MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.
- MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; ZICHE, M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 7, p. 521-530, 2003.
- MORI, S.; BARTH, H. G. **Size exclusion chromatography**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 3662039109.
- MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 373-411, 2012.
- MORTAZAVI, S. A.; CARPENTER, B. G.; SMART, J. D. An investigation of the rheological behaviour of the mucoadhesive/mucosal interface. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 221-225, 1992.
- MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; UR REHMAN, D. I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.
- MURPHY, B. M. et al. Structure, stability, and mobility of a lyophilized IgG1 monoclonal antibody as determined using second-derivative infrared spectroscopy. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 1, p. 81-91, 2012.
- MURPHY, R. M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 25-30, 1997.

- NAG, A.; HAN, K.-S.; SINGH, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 247-253, 2011.
- NAM, J.-P. et al. Insulin-incorporated chitosan nanoparticles based on polyelectrolyte complex formation. **Macromolecular research**, v. 18, n. 7, p. 630-635, 2010.
- NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Iontropic Gelation Method. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 267-277, 2010.
- NEGRÃO, M. R. B. S. S. **Mecanismos de modulação da inflamação e angiogênese por polifenóis naturais**. 2012. 167 f. Tese (Doutorado em Metabolismo, Clínica e Experimentação) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2011.
- NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature materials**, v. 8, n. 7, p. 543, 2009.
- NEUFELD, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 1, p. 9-22, Jan 1999.
- NORRBY, K. In vivo models of angiogenesis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 3, p. 588-612, 2006.
- OGAWARA, K.-I. et al. In vivo anti-tumor effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumor-bearing mice: Involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells. **Journal of controlled release**, v. 133, n. 1, p. 4-10, 2009.
- OLIVEIRA CARDOSO, V. M. et al. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 65, p. 317-333, 2017.
- OLIVEIRA, A. T.; QUEIROZ, A. P. A. PERFIL DE USO DA TERAPIA ANTINEOPLÁSICA ORAL: A IMPORTÂNCIA DA ORIENTAÇÃO FARMACÊUTICA. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 3, n. 4, p. 24-29, 2012.
- OLIVEIRA, G. F. et al. Chitosan–pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 1004-1009, 10/15/2010.

- OLIVEIRA, J. T. et al. Gellan gum injectable hydrogels for cartilage tissue engineering applications: in vitro studies and preliminary in vivo evaluation. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 1, p. 343-53, 2010.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-30, 2011.
- OLIVEIRA, S. S. M. **Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação in vitro e in vivo**. 2014. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo (USP), 2014.
- ORIVE, G. et al. Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy. **Cancer Therapy**, v. 3, n. 1, p. 131-8, 2005.
- OSMAŁEK, T. et al. Design and characteristics of gellan gum beads for modified release of meloxicam. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 43, n. 8, p. 1314-1329, 2017.
- 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.
- PAPADOPOULOU, V. et al. 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.
- PARADA, R. et al. A política nacional de atenção oncológica e o papel da atenção básica na prevenção e controle do câncer. **Revista de APS**, v. 11, n. 2, p. 199, 2008.
- PARAGINSKI, R. T. et al. Characteristics of starch isolated from maize as a function of grain storage temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 0, p. 88-94, 2014.
- PARK, E. Y.; BAIK, B.-K.; LIM, S.-T. Influences of temperature-cycled storage on retrogradation and in vitro digestibility of waxy maize starch gel. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 43-48, 2009.
- PARVEEN, S.; SAHOO, S. K. Evaluation of cytotoxicity and mechanism of apoptosis of doxorubicin using folate-decorated chitosan nanoparticles for targeted delivery to retinoblastoma. **Cancer nanotechnology**, v. 1, n. 1-6, p. 47-62, 2010.

- PASCOAL, Aline Mendonça. **Extração e caracterização do amido de lobeira (*solanum lycocarpum*)**. 2014. 69 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.
- PASQUEL, A. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas**, v. 33, p. 86-97, 1999.
- PATEL, S. P. et al. Novel pentablock copolymer-based nanoparticulate systems for sustained protein delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 2, p. 327-343, 2015.
- PATIL, S. et al. Study of Formulation Variables on Properties of Drug-Gellan Beads by Factorial Design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 3, p. 315-326, 2006.
- PAULA, J. S. et al. Bevacizumab-loaded Polyurethane Subconjunctival Implants: Effects on Experimental Glaucoma Filtration Surgery. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 14, p. 640-640, 2011.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010. ISBN 8522107084.
- PAVLIDIS, E. T.; PAVLIDIS, T. E. Role of bevacizumab in colorectal cancer growth and its adverse effects: a review. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 31, p. 5051, 2013.
- PEDREIRO, L. N. et al. Mucoadhesive Nanostructured Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier to Improve Zidovudine Permeability. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1248-1256, 2016.
- PENG, Q.-J.; PERLIN, A. S. Observations on N.M.R. spectra of starches in dimethyl sulfoxide, iodine-complexing, and solvation in water-di-methyl sulfoxide. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 57-72, 1987.
- PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.
- PEREIRA, D. R. et al. Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 10, p. 961-972, 2011.

- PEREIRA, J. et al. The role of endothelial cells in hematologic malignancies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 3, p. 223-228, 2008.
- PETERS, S. et al. Antipermeability and antiproliferative effects of standard and frozen bevacizumab on choroidal endothelial cells. **The British journal of ophthalmology**, v. 91, n. 6, p. 827-831, 2007.
- PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Chitosan–gellan electrostatic complexes: Influence of preparation conditions and surfactant presence. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 695-703, 2013.
- PICOUT, D. R.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheology of biopolymer solutions and gels. **The Scientific World Journal**, v. 3, p. 105-121, 2003.
- PINTO, G. H. V. P. **Cinemática de partículas em fluidos de viscosidade variável com o tempo e sua aplicação na construção de poços de petróleo: avaliação durante paradas operacionais**. 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
- POLESI, Luis Fernando. **Amido resistente obtido a partir de amido de leguminosas e de seus hidrolisados**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. doi:10.11606/D.11.2009.tde-09092009-150507.
- PRAJAPATI, V. D. et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydr Polym**, v. 93, n. 2, p. 670-8, 2 2013.
- PRASANTH, V.; JAYAPRAKASH, R.; MATHEW, S. T. Colon specific drug delivery systems: a review on various pharmaceutical approaches. **J Appl Pharm Sci**, v. 2, n. 01, p. 163-9, 2012.
- PRESS, B.; DI GRANDI, D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. **Current drug metabolism**, v. 9, n. 9, p. 893-900, 2008.
- PREZOTTI et al. 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.

PREZOTTI, F. et al. Gellan Gum/Pectin Beads Are Safe and Efficient for the Targeted Colonic Delivery of Resveratrol. **Polymers**, v. 10, n. 1, p. 50, 2018.

PREZOTTI, F. G. **Micro/nanopartículas mucoadesivas de goma gelana e pectina para a liberação cólon-específica do resveratrol**. 2017. 302f Tese (Doutorado). Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". 2017.

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.

RAHIMI, N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 3, p. 538-548, 2012.

RAJINIKANTH, P.; MISHRA, B. Preparation and in vitro characterization of gellan based floating beads of acetohydroxamic acid for eradication of H. pylori. **Acta Pharmaceutica**. 57: 413 p. 2007.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International journal of pharmaceutics**, v. 455, n. 1-2, p. 219-228, 2013.

RANA, V. et al. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate polymers**, v. 83, n. 3, p. 1031-1047, 2011.

RANGARI, N.; PURANIK, P. Review on Recent and Novel Approaches to Colon Targeted Drug Delivery System. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, 2015.

RANIERI, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1845-1857, 2006.

RASHID, I. et al. A novel multifunctional pharmaceutical excipient: Modification of the permeability of starch by processing with magnesium silicate. **International journal of pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 18-26, 2011.

READING, M.; CRAIG, D. Q. M. Principles of Differential Scanning Calorimetry – **Chapter 1: Thermal Analysis of Pharmaceuticals**, Taylor ; Francis Group, LLC, 2007, 21p.

- RECIFE, A. C. D. et al. Evaluation of retrograded starch as excipient for controlled release matrix tablets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 40, p. 83-94, / 2017.
- REDDY, T.; TAMMISHETTI, S. Gastric resistant microbeads of metal ion cross-linked carboxymethyl guar gum for oral drug delivery. **Journal of microencapsulation**, v. 19, n. 3, p. 311-318, 2002.
- REGISTRO AVASTIN ANVISA 2005. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351255514200483/>>. Acessado em: 27/02/2019.
- RESHETNYAK, Y. K.; BURSTEIN, E. A. Decomposition of Protein Tryptophan Fluorescence Spectra into Log-Normal Components. II. The Statistical Proof of Discreteness of Tryptophan Classes in Proteins. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1710-1734, 2001.
- RIANNA, C.; KUMAR, P.; RADMACHER, M. The role of the microenvironment in the biophysics of cancer. **Semin Cell Dev Biol**, v. 73, p. 107-114, 2018.
- RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. **Experimental cell research**, v. 328, n. 2, p. 314-324, 2014.
- RIOUX, B. et al. Structure-properties relationship in cross-linked high amylose starch cast films. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 4, p. 371-378, 2002.
- RODEMBUSCH, F. **Espalhamento de luz estático e dinâmico em polímeros do tipo polimetacrilato, fluorescentes por transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (TPIEE)**. 2001. 91 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- RODRIGUES, A.; EMEJE, M. Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 987-994, 2012.
- ROMDHANE, A. et al. Effect of pH and ionic strength on the electrical charge and particle size distribution of starch nanocrystal suspensions. **Starch - Stärke**, v. 67, n. 3-4, p. 319-327, 2015.
- ROSAS-FLORES, W.; RAMOS-RAMÍREZ, E. G.; SALAZAR-MONTOYA, J. A. Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1011-1017, 2013.

- ROSSI, S. et al. Characterization of chitosan hydrochloride–mucin rheological interaction: influence of polymer concentration and polymer:mucin weight ratio. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 4, p. 479-485, 2001.
- ROSSI, Silvia et al. Influence of mucin type on polymer-mucin rheological interactions. **Biomaterials**, v. 16, n. 14, p. 1073-1079, 1995.
- ROYER, C. A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. **Chemical reviews**, v. 106, n. 5, p. 1769-1784, 2006.
- SABATINI, C. A. **Investigação da hidrólise enzimática de derivados da quinizarina por espectroscopia e microscopia de fluorescência**. 2012. 110f. Doutor em ciências Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.
- SADEGH POURSHAHAB, P. et al. **Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid**. 2011. 605-13
- 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. 1666-2005.
- SALTZ, L. B. et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 12, p. 2013-9, 2008.
- SALUNKE, S. R.; PATIL, S. B. Ion activated in situ gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 41-47, 2016.
- SARKAR, D. et al. Sustained release gastroretentive tablet of metformin hydrochloride based on poly (acrylic acid)-grafted-gellan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 137-148, 2017.
- SARMENTO, B. et al. Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 8, n. 5, p. 607-21, 2012.
- SASICH, L. D.; SUKKARI, S. R. The US FDA's withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 4, p. 381-385, 2012.

- SASICH, L. D.; SUKKARI, S. R. The US FDAs withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 4, p. 381-385, 2012.
- SCHATZ, C. et al. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1882-1892, 2004.
- SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. Artliber Ed., 2006. ISBN 8588098342.
- SCHWEIZER, D. et al. Protein–Polyanion Interactions for the Controlled Release of Monoclonal Antibodies. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 1, p. 75-83, 2013.
- SCOTT, H. Rheology. In: **Remington. The science and practice of pharmacy**. 20^{ed}. Philadelphia: Editora Lippincott, 2000, cap.23, p. 335-355.
- SELLERS, L. A. et al. Mucus glycoprotein gels. Role of glycoprotein polymeric structure and carbohydrate side-chains in gel-formation. **Carbohydrate research**, v. 178, n. 1, p. 93-110, 1988.
- SELVERIO, G. A. **Propriedades reológicas de exopolissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros**. 2009. 110 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Jose do Rio Preto, 2009.
- SEPASSI, S. et al. Effect of polymer molecular weight on the production of drug nanoparticles. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 10, p. 2655-2666, 2007.
- SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the Origin of Cancer Metastasis. **Critical reviews in oncogenesis**, v. 18, n. 1-2, p. 43-73, 2013.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.
- SHAMAI, K.; BIANCO-PELED, H.; SHIMONI, E. Polymorphism of resistant starch type III. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 3, p. 363-369, 2003.
- SHANTHA, K.; RAVICHANDRAN, P.; RAO, K. P. Azo polymeric hydrogels for colon targeted drug delivery. **Biomaterials**, v. 16, n. 17, p. 1313-1318, 1995.

- SHARMA, D. et al. Formulation and Optimization of Polymeric Nanoparticles for Intranasal Delivery of Lorazepam Using Box-Behnken Design: In Vitro and In Vivo Evaluation. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 14, 2014.
- SHARMA, M. et al. Folic acid conjugated guar gum nanoparticles for targeting methotrexate to colon cancer. **J Biomed Nanotechnol**, v. 9, n. 1, p. 96-106, 2013.
- SHIH, T.; LINDLEY, C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. **Clinical therapeutics**, v. 28, n. 11, p. 1779-1802, 2006.
- SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1348, n. 1, p. 20-31, 2015.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: an improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics (the “sequential layer” model). **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 10, p. 1290-1298, 2000.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 163-174, 2012.
- SIGNORELLO, L. et al. Quantification, microbial contamination, physico-chemical stability of repackaged bevacizumab stored under different conditions. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 113-119, 2014.
- SILVA, C. et al. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 125-140, 2002.
- SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.
- SINGH, R.; LILLARD, J. W., JR. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and molecular pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.
- SINHA, R. et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1909-17, 2006.
- SINHA, R.; KIM, G. J.; NIE, S.; SHIN, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p.

1909 – 1917, 2006.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1–2, p. 19-38, 2001.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1–2, p. 19-38, 2001.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 1118210395.

SOARES, G. A. et al. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.

SOBOTTA, J. Atlas de anatomia humana: tronco, vísceras e extremidades inferiores. In: (Ed.). **Atlas de anatomia humana: tronco, vísceras e extremidades inferiores**, 2000.

SOCIETY, A. C. Cancer Facts and Figures 2018. **American Cancer Society**, p. 76 p., 2018.

SOLARO, R.; CHIELLINI, F.; BATTISTI, A. Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1928-1980, 2010.

SONJE, A. G.; MAHAJAN, H. S. Nasal inserts containing ondansetron hydrochloride based on Chitosan–gellan gum polyelectrolyte complex: In vitro–in vivo studies. **Materials Science and Engineering: C**, v. 64, p. 329-335, 2016.

SOUSA, F. et al. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3736, 2017.

SOUSA, F.; GONÇALVES, V. M. F.; SARMENTO, B. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the quantification of monoclonal antibody bevacizumab from polyester-based nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, n. Supplement C, p. 171-177, 2017.

SOUSA, F.; SARMENTO, B.; NEVES-PETERSEN, M. T. Biophysical study of bevacizumab structure and bioactivity under thermal and pH-stresses. **Eur J Pharm Sci**, v. 105, p. 127-136, 2017.

- SOWMAYA, C.; REDDY, G.; NEELABOINA, V. P. Colon specific drug delivery systems: A review on pharmaceutical approaches with current trends. **Int Res J Pharm**, v. 3, n. 7, p. 45-57, 2012.
- STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000. ISBN 8527700883.
- STROJNIK, T. et al. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. **Anticancer Res**, v. 30, n. 12, p. 4851-60, Dec 2010.
- SUBAUSTE, M. C. et al. Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. **Clinical & experimental metastasis**, v. 26, n. 8, p. 1033-1047, 2009.
- SURI, S. S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Journal of occupational medicine and toxicology**, v. 2, n. 1, p. 16, 2007.
- TAIZI, M. et al. A novel and rapid in vivo system for testing therapeutics on human leukemias. **Experimental hematology**, v. 34, n. 12, p. 1698-1708, 2006.
- TALARI, A. C. S. et al. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 52, n. 5, p. 456-506, 2017.
- TAN, C. et al. Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 236-245, 2016.
- TAUGOURDEAU-RAYMOND, S. et al. Bevacizumab-induced serious side-effects: a review of the French pharmacovigilance database. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 68, n. 7, p. 1103-7, Jul 2012.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.
- TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. II. Waxy rice starches. **Cereal Chem**, v. 67, n. 6, p. 558-563, 1990.
- THIRAWONG, N.; KENNEDY, R. A.; SRIAMORNSAK, P. Viscometric study of pectin–mucin interaction and its mucoadhesive bond strength. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 170-179, 2008.

- THOMPSON, D. B. Strategies for the manufacture of resistant starch. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 245-253, 2000.
- TIAN, L.; BAE, Y. H. Cancer nanomedicines targeting tumor extracellular pH. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 99, p. 116-26, 2012.
- TOLOUDI, M. et al. A possible clinical benefit of the identification and characterization of colon cancer stem cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 1, p. 22-27, 2015.
- TONON, L. M.; SECOLI, S. R.; CAPONERO, R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 2, p. 173-182, 2007.
- TRINH, K. S. Recrystallization of starches by hydrothermal treatment: digestibility, structural, and physicochemical properties. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 12, p. 7640-7654, 2015.
- TÜRKOĞLU, T.; TAŞCIÖĞLU, S. Novel strategy for the ionotropic crosslinking of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 6, 2014.
- TURNER, D. C. et al. Population pharmacokinetics of bevacizumab in children with osteosarcoma: implications for dosing. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 10, p. 2783–2792. 2014.
- TYAGI, P. et al. Light-Activated, In Situ Forming Gel for Sustained Suprachoroidal Delivery of Bevacizumab. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 8, p. 2858-2867, 2013.
- USP. United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 34-NF 29). Rockville, United States Pharmacopoeia Convention, 2011. p.2977-2979.
- VAN DER GUCHT, J. et al. Polyelectrolyte complexes: bulk phases and colloidal systems. **Journal of colloid and interface science**, v. 361, n. 2, p. 407-422, 2011.
- VARGAS, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1162-1176, 2007.
- VARMA, C. A. K.; PANPALIA, S.; KUMAR, K. J. Physicochemical and release kinetics of natural and retrograded starch of Indian palmyrah shoots. **International journal of biological macromolecules**, v. 66, p. 33-39, 2014.

- VASCONCELOS, C. L. **Obtenção de dispersões de complexos polieletrólíticos à base de quitosana e poli(ácido metacrílico) e análise de adsorção de albumina bovina sérica.** 2007. 99 f. Tese (Doutorado em Físico-Química; Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.
- VENTURINI, D. **Síntese do dímero da vanilina, desenvolvimento de sonda susceptível a dicroísmo circular induzido e sua aplicação para caracterização de sítios de ligação em albumina.** 2017. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2017.
- VERHEUL, H. M. W. et al. Platelets Take Up the Monoclonal Antibody Bevacizumab. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 18, p. 5341-5347, 2007.
- VERMEER, A. W.; NORDE, W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. **Biophysical journal**, v. 78, n. 1, p. 394-404, 2000.
- VILELA, J. A. P. et al. Preparation, characterization and in vitro digestibility of gellan and chitosan–gellan microgels. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 54-62, 2015.
- VIMAL, S. et al. Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. **Aquaculture**, v. 358, p. 14-22, 2012.
- VOLPE, D. A. et al. Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay. **Clinical Research and Regulatory Affairs**, v. 24, n. 1, p. 39-47, 2007.
- WALTER, M.; SILVA, L. P.; DENARDIN, C. C. Rice and resistant starch: different content depending on chosen methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 4, p. 279-285, 2005.
- WALTER, R. H. **Polysaccharide dispersions: chemistry and technology in food.** Academic Press, 1997. ISBN 0080539238.
- WANG, C.; HO, P. C.; LIM, L. Y. Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1-2, p. 201-10, 2010.

- WANG, F.; WEN, Y.; BAI, T. The composite hydrogels of polyvinyl alcohol–gellan gum-Ca²⁺ with improved network structure and mechanical property. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 268-275, 2016.
- WANG, S. et al. Starch retrogradation: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 568-585, 2015.
- WANG, S.; COPELAND, L. Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. **Food & Function**, v. 4, n. 11, p. 1564-1580, 2013.
- WANG, Y.; FEI, D.; VANDERLAAN, M.; SONG, A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. **Angiogenesis**, v. 7, n. 4, p. 335-345, 2004.
- WARREN, H.; IN HET PANHUIS, M. Highly conducting composite hydrogels from gellan gum, PEDOT:PSS and carbon nanofibres. **Synthetic Metals**, v. 206, p. 61-65, 2015.
- WARREN, R. S. et al. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 4, p. 1789-1797, 1995.
- WEHLAND, M. et al. Biomarkers for Anti-Angiogenic Therapy in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9338-9364, 2013.
- WEI, B. et al. Effect of pHs on dispersity of maize starch nanocrystals in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 369-373, 2014.
- WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1359-1370, 2011.
- WILSON, C. G. The transit of dosage forms through the colon. **International journal of pharmaceutics**, v. 395, n. 1, p. 17-25, 2010.
- WILSON, P. J.; BASIT, A. W. Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: An in vitro study using amylose coated tablets. **International journal of pharmaceutics**, v. 300, n. 1, p. 89-94, 2005.
- WOITISKI, C. B. et al. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 25-33, 2009.

- XU, X. et al. Characterization of konjac glucomannan–gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 2, p. 192-197, 2007.
- YAN, L.; HSU, K.; BECKMAN, R. A. Antibody-based therapy for solid tumors. **The Cancer Journal**, v. 14, n. 3, p. 178-183, 2008.
- YANG, H. et al. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. **Nature protocols**, v. 10, n. 3, p. 382-396, 2015.
- YASSIN, A. E. B. et al. Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer. **International journal of medical sciences**, v. 7, n. 6, p. 398, 2010.
- 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.
- YU, H.; HUANG, Q. Investigation of the absorption mechanism of solubilized curcumin using Caco-2 cell monolayers. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 17, p. 9120-6, 2011.
- ZAVAREZE, E. D. R.; DIAS, A. R. G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 317-328, 2011.
- ZHANG, A. et al. Distinct aggregation mechanisms of monoclonal antibody under thermal and freeze-thaw stresses revealed by hydrogen exchange. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 1, p. 236-250, 2012.
- ZHANG, L. et al. Slowly digestible starch prepared from rice starches by temperature-cycled retrogradation. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 970-974, 2011.
- ZHANG, Z.; PAN, H.; CHEN, X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. **Mass spectrometry reviews**, v. 28, n. 1, p. 147-176, 2009.
- ZHAO, H. et al. Local antitumor effects of intratumoral delivery of rIL-2 loaded sustained-release dextran/PLGA–PLA core/shell microspheres. **International journal of pharmaceuticals**, v. 450, n. 1-2, p. 235-240, 2013.
- ZHOU, X. et al. Retrogradation of waxy and normal corn starch gels by temperature cycling. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 1, p. 57-65, 2010.

ZIA, K. M. et al. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1068-1087, 2018.

ANEXOS


**COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS**
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO BEVACIZUMABE EM MODELO DE MEMBRANA CORIOLONTÓICA: ESTUDOS IN VIVO ", protocolada sob o CEUA nº 7210310718, sob a responsabilidade de **Hilde Harb Buzzá e equipe; Valéria Maria de Oliveira Cardoso; Hilde Harb Buzzá; Vanderlei Salvador Bagnato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo (CEUA/IFSC) na reunião de 29/08/2018.

We certify that the proposal "Analysis of antiangiogenic activity of nanostructures systems with Bavacizumab in Chorioallantoic Membrane Model: In vivo studies", utilizing 150 Birds (males and females), protocol number CEUA 7210310718, under the responsibility of **Hilde Harb Buzzá and team; Valéria Maria de Oliveira Cardoso; Hilde Harb Buzzá; Vanderlei Salvador Bagnato** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Physics Institute of São Carlos - São Paulo University (CEUA/IFSC) in the meeting of 08/29/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2018** a **12/2018** Área: **Grupo de Óptica / Fcm**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 14 dias**

N: **150**

Linhagem: **Ovos de Galinha**

Peso: **10 a 50 g**

Local do experimento: Laboratório de Biofotônica - IFSC/USP

São Carlos, 27 de novembro de 2018

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo